

Université de Montréal

**L'entérotoxine STb d'*Escherichia coli* affecte les jonctions serrées des  
cellules intestinales épithéliales**

par

**Clément Ngendahayo Mukiza**

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Août 2012

## RÉSUMÉ

La toxine thermostable d'*E.coli* (STb) est une cause de diarrhée chez l'homme et l'animal. STb se lie au sulfatide, son récepteur, puis s'internalise. Dans le cytoplasme, par une cascade d'événements, STb déclenche l'ouverture des canaux ioniques permettant la sécrétion des ions et la perte d'eau menant à la diarrhée. Les jonctions serrées forment une barrière physique intercellulaire dans les cellules épithéliales intestinales, contrôlant ainsi le flux paracellulaire des ions et de l'eau. Les jonctions serrées sont affectées par divers pathogènes et par leurs toxines. À ce jour, l'effet de STb sur les jonctions serrées n'a pas été étudié. L'étude entreprise visait à explorer l'effet de STb sur les jonctions serrées et la barrière épithéliale des cellules intestinales. Des cellules épithéliales intestinales du colon humain (T84) ont été traitées pendant 24h soit avec la toxine STb purifiée soit avec une souche d'*E.coli* exprimant STb. La résistance transépithéliale (TER), le flux de marqueurs paracellulaires et la microscopie confocale ont été utilisés pour analyser les effets de STb sur les jonctions serrées. Les monocouches traitées par la souche *E.coli* exprimant STb et la toxine STb purifiée ont manifesté une forte réduction de TER ( $p < 0.0001$ ) parallèlement à une augmentation significative de la perméabilité paracellulaire à l'Albumine de Sérum Bovin marqué avec l'IsoThioCyanate Fluoroscéine, BSA-FITC ( $p < 0.0001$ ) comparativement aux cellules non traitées et aux cellules traitées par une souche d'*E.coli* commensale non-toxinogène. L'augmentation de la perméabilité paracellulaire induite par STb a été associée à une dissolution générale et une condensation des fibres de stress centrales des filaments d'actine. Le réarrangement des filaments d'actine a été accompagné par une redistribution et une fragmentation des protéines des jonctions serrées dont l'occludine, la claudine-1 et la Zonula Occludens-1. Les mêmes modifications ont été observées après l'intoxication des cellules T84 avec un octapeptide synthétique retrouvé dans la séquence de STb correspondant à une séquence consensus de la toxine ZOT de *Vibrio cholerae*, impliquée dans la réorganisation des jonctions serrées. Cet effet n'a pas été observé lorsque les cellules ont été traitées avec un octapeptide synthétique comportant les mêmes acides aminés mais distribués de façon aléatoire ou avec la toxine mutée (D30V). Nos résultats montrent pour la première fois que STb induit le dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale en modifiant la distribution des protéines des jonctions

serrées. Ces résultats ouvrent une nouvelle voie pour la compréhension de la pathogenèse de diarrhée causée par la toxine STb.

**Mots-clés :** Jonctions serrées, cytosquelette d'actine, résistance transépithéliale, diarrhée, perméabilité paracellulaire, *Escherichia coli*, sécrétion, toxine STb.

## **ABSTRACT**

*Escherichia coli* heat-stable toxin (STb) causes diarrhea in Man and animals. STb binds to sulfatide, its receptor, followed by its internalization. Inside the cytoplasm, through a cascade of events, STb triggers the opening of ion channels allowing ion secretion and water loss leading to diarrhea. Tight junctions (TJs) are well known for controlling paracellular traffic of ions and water by forming a physical intercellular barrier in epithelial cells. Some bacterial toxins are known to affect adversely TJs. To date, the impact of STb on TJs has not been investigated. The present study aimed to explore the effect of STb on TJs and the barrier function in intestinal epithelial cells. Human colon intestinal epithelial cells (T84) were treated for 24h with either purified STb toxin or an *E. coli* strains expressing STb. TransEpithelial Resistance (TER), paracellular flux marker and confocal microscopy were used to analyze the effect of STb toxin on TJs. An *E. coli* strains expressing STb as well as purified STb caused a significant reduction of TER ( $p < 0.0001$ ) parallelly to an increase in paracellular permeability to BSA-FITC ( $p < 0.0001$ ) compared to untreated cells or a commensal non toxinogenic *E. coli* strain. The increased paracellular permeability induced by STb was associated with a marked general dissolution and condensation of central F-actin stress fibers. F-actin disorganisation was accompanied by redistribution and fragmentation of occludin, claudin-1 and ZO-1 (Zonula Occludens-1) proteins. These changes were also observed following intoxication of T84 cells with an 8 amino acids peptide found in the STb sequence corresponding to a consensus sequence of *Vibrio cholerae* Zot toxin, shown to be involved in TJs disassembly. This effect was not observed with the scramble peptide and D30V mutant. Our findings suggest that STb induces epithelial barrier dysfunction by changes in tight junction proteins that could contribute to the observed diarrhea. These results provide new insight into the diarrhea pathogenesis caused by STb.

**Keywords:** Tight junctions, actin cytoskeleton, transepithelial resistance, diarrhea, paracellular permeability, *Escherichia coli*, secretion, STb toxin.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	i
ABSTRACT .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS .....	xvii
 INTRODUCTION .....	 1
REVUE DE LITTÉRATURE .....	4
1. <i>Escherichia coli</i> .....	5
1.1 Généralités.....	5
1.2 Classifications des <i>E.coli</i> pathogènes .....	6
1.2.1 Les EPEC.....	7
1.2.2 Les DAEC.....	8
1.2.3 Les EAEC.....	8
1.2.4 Les EHEC.....	9
1.2.5 Les EIEC.....	9
1.2.6 Les ETEC.....	10
1.3 Les <i>Escherichia coli</i> enterotoxinogène (ETEC) .....	10
1.3.1 Généralités.....	10
1.3.2 Pathogenèse.....	11
1.3.3 Les facteurs de virulence.....	12
1.3.3.1 Les fimbriae .....	13
1.3.3.2 Les entérotoxines .....	14
1.3.3.2.1 LT .....	14
1.3.3.2.1.1 LT-I .....	17

1.3.3.2.1.2 LT-II.....	17
1.3.3.2.2 Les toxines thermostables .....	18
1.3.3.2.2.1 Généralités .....	18
1.3.3.2.2.2 La toxine STa .....	18
1.4 La toxine STb.....	20
1.4.1 Généralités.....	20
1.4.2 Génétique.....	20
1.4.3 Biogenèse.....	21
1.4.4 Structure .....	23
1.4.5 Zonula Occludens Toxin (ZOT), STb et Zonuline.....	24
1.4.6 Variants de STb.....	25
1.4.7 Mécanisme d'action .....	26
1.4.7.1 Oligomérisation.....	26
1.4.7.2 Récepteur .....	26
1.4.7.3 Perméabilisation membranaire et internalisation.....	27
1.4.7.4 Modèle proposé du mécanisme d'action de STb .....	27
1.4.8 Intérêt clinique .....	29
1.4.9 Le développement des vaccins.....	31
2. Les jonctions intercellulaires.....	32
2.1 Les cellules épithéliales.....	32
2.2 La barrière épithéliale .....	33
2.2.1 Voie transcellulaire .....	34
2.2.2 Perméabilité paracellulaire.....	34
2.2.2.1 La mesure de la résistance transépithéliale (TER).....	35
2.2.2.2 Le passage des molécules marquées .....	36
2.3 Les jonctions serrées .....	36
2.3.1 Généralités.....	36
2.3.2 Structures des jonctions serrées .....	36
2.3.3 Organisation moléculaire des jonctions serrées .....	38



2.3.3.1 Les protéines transmembranaires .....	39
2.3.3.1.1 L'occludine .....	39
2.3.3.1.2 Les claudines .....	42
2.3.3.1.3 Les JAMs .....	42
2.3.3.1.4 Les Crumb (Crb) .....	44
2.3.3.2 Les protéines cytoplasmiques .....	44
2.4 La formation des jonctions serrées.....	45
2.5 Régulation fonctionnelle des jonctions serrées par les facteurs extracellulaires. ....	47
2.6 Toxines affectant les jonctions serrées.....	48
2.6.1 Toxine de <i>Bacteroides fragilis</i> (BFT) .....	48
2.6.2 L'Entérotoxine de <i>Clostridium perfringens</i> (CPE) .....	49
2.6.3 Les toxines A et B de <i>Clostridium difficile</i> .....	50
2.6.4 La toxine ZOT (Zonula Occludens Toxin) .....	50
3. Objectifs et approches expérimentales.....	52
 MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS .....	54
ARTICLE .....	55
<i>Escherichia coli</i> STb Enterotoxin Impairs Intestinal Epithelial Barrier Function by Altering Tight Junction Proteins .....	55
ABSTRACT .....	57
INTRODUCTION .....	58
MATERIALS AND METHODS .....	60
RESULTS .....	65
DISCUSSION .....	68
ACKNOWLEDGEMENTS .....	71
REFERENCES.....	72
FIGURE LEGENDS .....	77
FIGURES .....	80

DISCUSSION .....	86
1. La perméabilité et la résistance transépithéliale.....	87
2. Régulation des jonctions serrées .....	88
3. Modulation de la perméabilité paracellulaire via le cytosquelette d'actine .....	91
4. Le domaine de liaison au récepteur de STb est essentiel à la perméabilisation des jonctions serrées.....	93
5. Réorganisation des jonctions serrées, apoptose et diarrhée .....	94
6. Modèle proposé du mécanisme d'action de STb sur les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine.....	95
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	100
BIBLIOGRAPHIE .....	103

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Comparaison des séquences de ZOT, STb et de la zonuline .....	25
Tableau 2 : distribution des gènes des fimbriae et d'entérotoxines dans les souches <i>E. coli</i> isolées chez les porcelets diarrhéiques (Vidotto et al., 2009). .....	31
Tableau 3: Les différents types de jonctions intercellulaires des cellules épithéliales et leurs caractéristiques. ....	33

## LISTE DES FIGURES

### Revue de la littérature

Figure 1 : Microphotographie d' <i>E.coli</i> obtenue par microscopie électronique à balayage (sean griffin, 2009).....	5
Figure 2: Mécanisme de pathogenèse des <i>E.coli</i> entérotoxinogènes chez le porc.....	12
Figure 3: Trafic et effets intracellulaires de l'entérotoxine LT. ....	16
Figure 4: Effets cellulaires de l'entérotoxine STa et du peptide endogène guanyline. ....	19
Figure 5: Biogenèse et sécrétion de STb : modèle actuellement proposé.....	22
Figure 6: Structure secondaire de la toxine STb. ....	23
Figure 7: Structure tridimensionnelle de la toxine STb (Sukumar et al., 1995) ....	24
Figure 8: Mécanisme d'action proposé de la toxine STb. ....	28
Figure 9: Endohm-12 . ....	35
Figure 10: Structure des jonctions serrées. ....	37
Figure11: Organisation des complexes protéiques au sein des jonctions serrées (aktories et barbieri, 2005).....	39
Figure 12: Représentation schématique de l'occludine et la claudine. Adapté de (Gonzalez-mariscal et al., 2003). ....	41
Figure 13: Intéraction homophile des molécules jam. ....	43
Figure 14: Les jonctions serrées peuvent être altérées par divers pathogènes ainsi que par leurs toxines. ....	51
Figure 15: Modèle proposé du mécanisme d'action de STb sur les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine.....	98

## Article

Figure 1: STb produces a decrease in t84 transepithelial electrical resistance (ter) and an increase in paracellular permeability .....	80
Figure 2: The STb24-31 peptide produces a decrease in t84 transepithelial electrical resistance (TER) and an increase in paracellular permeability .....	81
Figure 3: STb enterotoxin influences f-actin organization in t84 intestinal epithelial cells.	82
Figure 4: STb24-31 peptide influences f-actin organization in t84 intestinal epithelial cells.....	83
Figure 5: Effects of STb on tight junction structural proteins.....	84
Figure 6: Effects of STb24-31 peptide on tight junction structural proteins.....	85

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>5-HT</b>	5-hydroxytryptamine
<b>A (Ala)</b>	Alanine
<b>aa</b>	amino acids
<b>AAF</b>	Aggregative Adherence Fimbriae
<b>AC</b>	Adenylate Cyclase
<b>AIDA-I</b>	Adhesin Involved in Diffuse Adherence
<b>AMPC</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>ASIP</b>	Atypical PKC Isotype-Specific interacting Protein
<b>BFT</b>	<i>Bacteriodes fragilis</i> Toxin
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CaMKII</b>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
<b>Cdc 42</b>	Cell division control 42
<b>CFA-I</b>	Colonization Factor A-1
<b>CFAs</b>	Facteurs Antigéniques de Colonisation
<b>CFs</b>	Colonization Factors
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
<b>CFU</b>	Colony Forming Units
<b>CNF</b>	Facteur Cytotoxique Nécrosant
<b>CPE</b>	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
<b>CPE-R</b>	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin- Receptor
<b>Crb</b>	Crumb
<b>CRIB</b>	Cdc42/ Rac Interactive Binding
<b>CT</b>	Cholera toxin
<b>D (Asp)</b>	Aspartate
<b>DA</b>	Diffuse Adherence
<b>DABCO</b>	1, 4-diazabicyclo [2.2.2] octane
<b>DAEC</b>	Diffusely Adherent <i>Escherichia coli</i>
<b>DAF</b>	Decay Accelerating Factor

<b>DAG</b>	DiAcylGlycerol
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-phenylindole
<b>Dig</b>	Disc large
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>EAEC</b>	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
<b>EAST-1</b>	Enteroaggregative heat-stable toxin 1
<b>EDTA</b>	Ethylene diamine tetraacetic acid
<b>EHEC</b>	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
<b>EIEC</b>	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
<b>EPEC</b>	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
<b>ETEC</b>	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>GC-C</b>	Guanylate cyclase type C
<b>GK</b>	Guanylate Kinase
<b>GM2</b>	Monosialotetrahexosylganglioside
<b>GMPc</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HA/P</b>	HaemAgglutinin Protease
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>HuASH1</b>	Absent Small or homeotic discs 1
<b>IP3</b>	Inositol 1, 4, 5 Triphosphate
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
<b>JAMs</b>	Junctional Adhesion Molecules
<b>K (Lys)</b>	Lysine
<b>LA</b>	Localized Adherence
<b>LEE</b>	Locus d'Effacement d'Entérocytes
<b>LT</b>	Heat-labile toxine
<b>MAGI</b>	Membrane Associated Guanylate kinase with Inverted domain structure

<b>MAK</b>	Mitogen Activated Kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>MARCKS</b>	Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate
<b>MBP-STb</b>	Maltose-binding protein – Heat stable enterotoxin b
<b>MLCK</b>	Myosin Light Chain Kinase
<b>MUPP1</b>	Multi-PDZ domain Protein-1
<b>Mv</b>	Microvillosités
<b>NSP4</b>	No Structural Protein 4
<b>PAA</b>	Porcine Attaching and effacing Associated Factor
<b>Pals</b>	Protein associated with lin-7
<b>Par-3</b>	Partitioning defective-3
<b>PATJ</b>	Protein Associated with Tight Junctions
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PDS</b>	Post Synaptic Density
<b>PDZ</b>	PDS, Dig et ZO
<b>PGE2</b>	ProstaGlandin E2
<b>PKA</b>	Protein Kinase AMPc-dependant
<b>PKCa</b>	Protein Kinase C atypique
<b>PMSF</b>	Phenylmethysulfonyl fluoride
<b>PP2A</b>	Protein Phosphatase 2A
<b>R (Arg)</b>	Arginine
<b>RTX</b>	Repeats in Toxin
<b>SAF-B</b>	Scaffold Attachment Factor -B
<b>SAT</b>	Secreted Autotransporter Toxin
<b>SH-3</b>	Sequency Homology-3
<b>ShET1</b>	Shigella Enterotoxin-1
<b>ST</b>	Heat-stable
<b>STa</b>	Heat-stable enterotoxin a
<b>STb</b>	Heat-stable enterotoxin b



<b>Stx</b>	Shiga-like toxin
<b>TFA</b>	TriFluoroacetic Acid
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor- $\beta$
<b>TJs</b>	Tight Junctions
<b>TolC</b>	Outer membrane channel protein
<b>TPA</b>	12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate
<b>TSL</b>	Toxin Specific Locus
<b>UDP</b>	Uridine diphosphate
<b>V(Val)</b>	Valine
<b>VT</b>	Vérocytotoxine
<b>ZO -1</b>	Zonula Occludens-1
<b>ZO -2</b>	Zonula Occludens-2
<b>ZO -3</b>	Zonula Occludens-3
<b>ZO</b>	Zonula Occludens
<b>ZONAB</b>	ZO-1 associated Nucleic Acid Binding protein
<b>ZOT</b>	Zonula Occludens Toxin

## REMERCIEMENTS

J'ai attendu jusqu'au dernier moment pour écrire ces remerciements car la maîtrise, ce n'est pas que les manipulations et le manuscrit qui ponctuent deux années de travail, ce sont aussi de nombreuses rencontres.

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement Dr J. Daniel Dubreuil, qui, en tant que Directeur de recherche, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de mon projet, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour.

Mes remerciements s'adressent également à Dr Mario Jacques et Dr Carl Gagnon pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon comité conseil. J'associe à ces remerciements Dre Ann Letellier et Dr Mario Jacques pour avoir accepté de participer à mon jury. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir consacré une partie de votre temps à lire et juger ce travail.

Dans le désordre, gros merci à Claudia Syed pour m'avoir initié aux techniques de laboratoire ; à Claudia Duquette pour la technique d'ELISA, à Marco Langlois pour les figures de mon article ; à Alain Villard Bimenyimana et Guy Beauchamp pour votre soutien en analyses statistiques ; à Christian Bellehumeur, Christian Savard, ainsi que Chantal Provost pour tous les côtés techniques de la lecture de microplaque et la microscopie à fluorescence, à Simo M. Checabab pour les bons moments passés ensemble à la CSM 2012 à Vancouver. Il y en a ; à Frédéric Berthiaume pour sa patience face à la prise des photos en microscopie confocale ; à Jason Létourneau pour son aide à l'élaboration du protocole de marquage des filaments d'actine, à Rémi Lavoie pour le transport à l'Université de Montréal. Hassan Nassour, ça a été un plaisir de travailler avec toi pendant ces 8 mois, je n'oublierai pas ton petit bonjour cousin, chaque matin, qui mettait un peu de bonne humeur dans le labo.

Je remercie très chaleureusement tout le personnel du GREMIP pour les conditions de travail enthousiasmantes qu'il m'a fournies. Je suis notamment reconnaissant au CRIP et la Faculté de médecine vétérinaire pour les bourses qu'ils m'ont octroyées et qui m'ont permis d'avancer dans mon projet sans trop de soucis financiers et de participer aux congrès. Merci à tous les étudiants et les stagiaires à la Faculté de médecine vétérinaire avec lesquels j'ai pu échanger sur le plan scientifique et personnel en particulier Skander Hathroubi, Makrem Arfaoui, Gustave de Oliveira Zamberlam, etc.

J'ai eu l'occasion de faire plusieurs rencontres enrichissantes dans les colloques, merci entre autres à Llerena Vergas Evelyn Mercedes, Cristina Paiva de Sousa, Passoret Voumba et Renato Pariz Maluta. Merci aussi à tous ceux à qui j'ai posé une ou plusieurs question(s) en deux ans et à laquelle ils ont répondu en prenant sur leur temps quel que soit son niveau d'intérêt.

Et puis surtout, merci à tous ceux avec qui j'ai discuté d'autre chose que mon projet autour d'un café, au restaurant, en famille ou encore en faisant voler un petit planeur dans les parcs de Montréal ou en se promenant à Québec city et à Ottawa, etc. Et à propos de ça : mes vifs remerciements vont vers mon cousin Frédéric Rushishikara, Stéphanie Kokibali, Herman Kanyamahanga, Joselyne Ingabire, Deo Tabu, Evelyn Ndikumana, Teddy, Herbert Ndungutse, Janvier Ndaruhutse, Tumusenge Philbert, Pascal Maniraho, Daniel Kabagema, Jean Baptiste Mukiza, Diane Umutoni, Lea Gacuti, Joseph Sarto Ngarambe qui peuplent et font vivre les gros bateaux en fer qui nous servent bien !!!

Je ne serais jamais parvenu à cette étape majeure de mon cheminement personnel et professionnel, le dépôt de mon mémoire de maîtrise, sans le support de ma famille et de mes proches. Il y a ma famille sans qui chacun le sait je ne serais pas arrivé jusqu'ici. Les meilleurs sentiments sont destinés à Emmanuel Habyalimana et Bernardine Umulisa « mon oncle et sa femme », Immaculée Nakure, Jean Marie Rushishikara et Jean Gervais Rushishikara « ma tante et mes cousins », Claudette Mukabatsinda et Papias Nalinkamba « ma tante et son mari ». Merci pour les vacances passées chez vous et ces pique-niques étonnants, vous avez été mon équilibre, mes racines, bref ma famille. Sans vous je n'y serais jamais arrivé.

Une pensée à mon cousin Abbé Jean De Dieu Ntibeshya et ma belle famille, parce que ça fait du bien d'avoir des personnes sur lesquelles on sait que l'on peut compter, merci pour vos prières et surtout les conversations réconfortantes.

Il me serait difficile de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce parcours tortueux qu'est la maîtrise. En espérant n'oublier personne, je souhaiterais adresser mes sincères remerciements à Ignace Habineza et Chantal Mushema, son épouse, pour leur amitié et pour le temps qu'on a passé ensemble, vos encouragements m'ont été vraiment une aide précieuse. Ces remerciements s'adressent aussi à tous mes collègues de Paris, et je pense particulièrement à Jean Claude Mugisha et sa conjointe Claire, Sylvestre, Pierre Claver Ndayizeye, Diane Mukarugwiro. Merci d'avoir contribué à ce travail par le biais de votre amitié et de votre soutien moral, les bons moments passés avec vous à Paris sont inoubliables

Puis, il y a ma famille proche. Tout d'abord, je souhaite bien évidemment remercier ma compagne Rosine Uwizeye pour ta tendresse, ton amour, ton caractère, pour le privilège et le bonheur que j'ai à partager ta vie. Pour notre histoire, notre amitié passée, notre amour présent et tout ce qui nous attend encore, ton soutien m'a aidé dans l'accomplissement de ce travail. Ma chère Rosy, ce mémoire t'est dédié.

Par ailleurs, c'est avec beaucoup d'émotions que je remercie mes frères (Gilbert Ngendahayo, Jean Paul Bizimana, Eric Dushimiyimana, Philbert Bagirimana, Norbert Tabaro) et ma sœur (Clémentine Munezero) pour leurs nombreux sacrifices ainsi que pour leur soutien et la confiance qu'ils m'ont toujours accordés. Il m'est difficile de traduire par les mots l'affection que je leur réserve. Aussi, est-ce à eux que je dédie ces heures de travail, de joies et de souffrances qu'ils ont partagés. J'espère qu'ils se réjouissent de la réussite qui couronne mes efforts.

Mais surtout merci à mes parents pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, ils se sont beaucoup sacrifiés pour m'offrir toutes les conditions nécessaires : la vie, leur amour inconditionnel, leur confiance, leur soutien mais aussi l'éducation afin que je puisse devenir ce que je suis. Ma reconnaissance envers vous est inexprimable, c'est pourquoi je voudrais leur dédier ce travail.

J'ai presque oublié de remercier mes précieuses petites cellules qui ont sacrifié leurs vies pour l'avancée de la science.

Merci à toutes et à tous!!!!

## **INTRODUCTION**

La majorité des *Escherichia coli* sont des micro-organismes symbiotiques de la flore intestinale des animaux ainsi que de l'homme. Certaines souches sont pathogènes et les *E.coli* entérotoxigènes (ETEC) représentent un des groupes responsables de diarrhée chez l'animal (Dubreuil, 2008).

Les ETEC sont également la cause de diarrhées humaines sévères, surtout chez les jeunes enfants, mais ils provoquent également la diarrhée du voyageur. Les ETEC adhèrent aux microvilli des cellules épithéliales de l'intestin grêle sans entraîner de lésions morphologiques et produisent les entérotoxines qui agissent localement sur les entérocytes (Ghai et al., 1980; Nagy, 1999).

Les adhésines et les toxines sont deux facteurs de virulence des ETEC. Les adhésines les plus communes chez l'animal sont les fimbriae (pili) de surface: F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41, F42, F165, F17 et F18. La connaissance de ces facteurs peut permettre la prévention et la thérapie des maladies (Nagy, 1999).

Deux types d'entérotoxines sont identifiés chez les ETEC en fonction de leur stabilité à la chaleur : les entérotoxines sensibles à la chaleur (LT) et les entérotoxines résistantes à la chaleur (ST), à savoir EAST-1, STa et STb. Toutes ces toxines causent une diarrhée aqueuse en diminuant l'absorption et en augmentant la sécrétion de fluides et d'électrolytes au niveau des entérocytes.

La toxine STb est une molécule de 5,2 kDa composée de 48 acides aminés comportant deux hélices alpha antiparallèles reliées par une boucle riche en glycine, dont 4 résidus cystéines qui participent à la formation de 2 ponts disulfures requis pour l'expression de l'entérototoxicité.

Cette toxine active une protéine-G liée à un canal calcique, qui entraîne une cascade d'événements aboutissant à la formation des PGE2 et 5-HT qui déclenchent le transport d'eau et des électrolytes pouvant mener aux diarrhées (Dubreuil, 2008). Il semble que STb n'augmente pas le niveau intracellulaire des nucléotides cycliques, mais stimule la sécrétion des anions via le canal CFTR par les cellules épithéliales de l'intestin en inhibant en même temps l'absorption d'eau et d'électrolytes,  $\text{Na}^+$ . Le mécanisme d'action exact reste à être déterminé (Nagy, 1999).

On sait que dans les organismes pluricellulaires, les cellules voisines ont souvent à leur surface des dispositifs qui les maintiennent côte à côte ou qui leur permettent de communiquer entre elles, ce sont les jonctions intercellulaires: les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires, les jonctions communicantes et les jonctions desmosomes/hémidesmosomes. La barrière intestinale est alors formée par les cellules épithéliales de l'intestin et les jonctions serrées entre elles. Le flux intestinal emprunte la voie transcellulaire par des pompes et des canaux membranaires spécifiques ou la voie paracellulaire contrôlée par les jonctions serrées.

Les jonctions serrées sont des assemblages macromoléculaires de protéines délimitant la région apicale. Elles sont constituées principalement par les protéines transmembranaires (occludines, claudines), Junctional Adhesion Molecules (JAMs) et les Zonula Occludens (ZO1, ZO2, ZO3) (Cui et al., 2010). Les jonctions serrées empêchent tout passage de macromolécules et de molécules polaires entre les cellules. Elles réduisent fortement le passage des ions et des petites molécules non-polaires. Les transports paracellulaires à travers les jonctions serrées sont peu limités quand la résistance électrique est faible ou très réduits quand la résistance électrique est élevée. Le degré de résistance électrique est en fonction du nombre de zones de contact dans la jonction où les membranes sont fusionnées.

Les jonctions serrées des cellules épithéliales sont affectées par divers pathogènes ainsi que par leurs toxines ou autres facteurs de virulence (Berkes et al., 2003). Cependant, jusqu'à présent aucune étude n'a évalué l'effet de la toxine STb sur les jonctions serrées, d'où notre hypothèse que les jonctions serrées sont affectées par la toxine STb et une perte de l'intégrité de ces structures pourrait expliquer la perte d'électrolytes et de l'eau de l'espace paracellulaire vers la lumière intestinale. Ceci expliquerait en partie la pathogenèse de diarrhée causée par STb.



## **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. *Escherichia coli*

### 1.1 Généralités

*E. coli*, également appelé colibacille est un bacille Gram-négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Découvert en 1885 par Théodore Escherich dans les selles des nourrissons, c'est un commensal commun de la flore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud. Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures suivant la naissance.



Figure 1 : Microphotographie d'*E.coli* obtenue par microscopie électronique à balayage (Sean GRIFFIN, 2009).

Certaines souches peuvent devenir pathogènes par acquisition de gènes de virulence et elles sont capables de causer des infections intestinales et extraintestinales à l'aide des facteurs de virulence qui perturbent les processus cellulaires normaux (Kaper et al., 2004).

Les facteurs de virulence qui distinguent les différents pathotypes d'*E.coli* sont codés par des plasmides, transposons, phages et les génomes des autres bactéries par transfert horizontal ou vertical des gènes. L'îlot de pathogénicité peut-être identifié dans les souches pathogènes car il possède une composition différente du reste du génome bactérien ce qui indique leur provenance d'autres espèces (Whittan, 1996).

*E.coli* est l'organisme le plus étudié dans les laboratoires de biologie moléculaire et constitue un modèle pour les études biochimiques et génétiques grâce à sa découverte précoce et sa culture aisée (Donnenberg et Whittam, 2001).

## **1.2 Classifications des *E.coli* pathogènes**

Certaines souches d'*E.coli* entraînent des pathologies très diverses tant chez l'homme que chez l'animal. Les gènes de virulence sont le plus souvent localisés sur des éléments génétiques transmissibles : les transposons, les plasmides et les bactériophages. Ils peuvent être situés aussi sur une grande partie de l'ADN chromosomique appelé îlot de pathogénicité.

On distingue au moins 6 différents pathotypes responsables des infections intestinales (Nataro et Kaper, 1998): les *E.coli* entéropathogènes (EPEC), entéroinvasives (EIEC), entérohémorragiques (EHEC), entéroaggrégatives (EAEC), les *E.coli* à adhérence diffuse (DAEC) et les entérotoxinogènes (ETEC).

En plus de ces pathotypes, il existe des souches d'*E.coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC) qui causent diverses infections invasives chez l'homme et chez l'animal. Les ExPEC rassemblent les *E.coli* responsables des septicémies (Mokady et al., 2005) et les méningites (MNEC) et les *E.coli* uropathogènes (UPEC). Ces dernières infections bactériennes sont majoritairement observées chez les jeunes femmes (Anderson et al., 2004).

Ces différentes souches pathogènes d'*E.coli* sont caractérisées par la présence d'antigènes fimbriaires, lipopolysaccharidiques (O), capsulaires (K) et flagellaires (H), leur conférant des sérotypes (définis par la combinaison des antigènes somatiques O et flagellaires H) ou des sérogroupes (définis par l'antigène somatique seul). Ces antigènes peuvent être retrouvés dans la nature avec plusieurs combinaisons possibles (Orskov et Orskov, 1992).

Malgré la diversité des affections provoquées par les souches pathogènes d'*E.coli*, toutes ces souches utilisent une stratégie classique d'infection commune à d'autres agents pathogènes, dont les points clés sont : colonisation de la muqueuse, multiplication, évasion des défenses de l'hôte, puis les dommages à l'hôte.

### **1.2.1 Les EPEC**

Les souches EPEC constituent une cause bactérienne majeure des gastroentérites infantiles dans les pays en voie de développement et entraînent des diarrhées chez les volontaires inoculés avec des souches EPEC et du bicarbonate de sodium (Sears et Kaper, 1996). L'adhérence des EPEC à la muqueuse intestinale est l'étape essentielle pour la pathogenèse des diarrhées et le phénotype est caractérisé par l'effacement des microvilli (Sears et Kaper, 1996). Beaucoup de souches EPEC adhèrent aux cellules Hep-2 et HeLa selon les modes: LA (localized adherence) où les bactéries s'attachent à certains endroits de la surface cellulaire et forment des microcolonies et DA (diffuse adherence) où les bactéries adhèrent aux cellules entières (Nataro et al., 1985).

Les souches EPEC des lapins s'attachent intimement et effacent les microvilli des cellules intestinales des lapins et des porcs, et la lésion histopathologique classique est nommée AE (Attaching and Effacing) (Moon et al., 1983). La manifestation de la lésion AE exige l'expression de plusieurs gènes de virulence tels que *eaeA* et *eaeB* (pour EPEC attaching and effacing A et B) localisés sur une région chromosomique de 35-kb appelée LEE (Locus of Enterocyte Effacement) (McDaniel et al., 1995). Cette région chromosomique, LEE est présente également chez les EHEC.

Les EPEC ne sont pas invasives et ne sécrètent pas d'entérotoxines, par contre elles produisent des cytotoxines similaires aux toxines shiga (Benz et Schmidt, 1989).

### **1.2.2 Les DAEC**

Le groupe des DAEC est l'une des 6 classes d'*E.coli* pathogènes causant des diarrhées. Les DAEC sont caractérisées par l'adhérence diffuse à la surface des cellules épithéliales (Scaletsky et al., 1984). Dans ce groupe, on distingue: a) les souches d'*E.coli* qui portent les adhésines fimbriaires (Afa/Dr (Afimbrial adhesins) et F1845). Ce sont des protéines qui sont associées aux infections du tractus urinaire ainsi que les entérites chez les enfants (Servin, 2005); b) les souches d'*E.coli* qui expriment l'adhésine afimbriaire impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I, Adhesin Involved in Diffuse Adherence) (Benz et Schmidt, 1989). Cette adhésine a été identifiée pour la première fois chez la souche 2787 isolée d'un enfant souffrant de diarrhée, mais elle est présente aussi chez les *E.coli* responsables des oedèmes et des diarrhées porcines post-sevrages (Niewerth et al., 2001). Après la fixation de F1845 sur son récepteur DAF (Decay-Accelerating Factor) à la surface cellulaire, la cellule hôte forme des extensions cellulaires qui englobent la bactérie. Certaines DAEC produisent des hémolysines ainsi que le facteur cytotoxique nécrosant (CNF).

### **1.2.3 Les EAEC**

Les EAEC sont caractérisées par l'adhérence aggrégative des cellules bactériennes à la surface cellulaire par des fimbriae AAF (Aggregative Adherence Fimbriae) conférant une structure identique aux briques empilées (Nataro et al., 1987). Ces souches adhèrent aux cellules sans sécréter les entérotoxines LT ou ST car elles n'ont pas les gènes pour ces entérotoxines, mais elles sont associées aux diarrhées diagnostiquées chez les américains ayant voyagé au Mexique (Mathewson et al., 1985). Elles sont capables de causer des diarrhées chez les volontaires adultes. Les EAEC stimulent la sécrétion du mucus qui capte les bactéries d'où la formation d'un biofilm: bactéries-mucus et la distension de l'intestin grêle (Tzipori et al., 1992).

Les EAEC causent également des effets cytotoxiques sur la muqueuse intestinale, à savoir des lésions destructives (Vial et al., 1988). Les EAEC sécrètent ainsi des cytotoxines et des entérotoxines dont on peut citer: plasmid-encoded toxin, ShET1 (Shigella enterotoxin 1) et EAST-1 (EnteroAggregative *E.coli* Heat Stable Toxin-1). Ces toxines jouent un rôle dans la sécrétion des ions par les entérocytes et remodelent le cytosquelette (Weintraub, 2007).

#### **1.2.4 Les EHEC**

Ce pathotype représente une classe de pathogènes intestinaux responsables des colites hémorragiques (Riley et al., 1983) et le syndrome urémique hémolytique (Karmali et al., 1983) causés par les souches O157:H7 et sa toxine respectivement. Les EHEC produisent la vérocytotoxine (VT), appelée aussi shiga-like toxine (Stx) (O'Brien et al., 1983), un facteur de virulence commun qui endommage les tissus intestinaux et rénaux (Karmali et al., 1983) et l'hémolysine de type RTX (Repeats in Toxin). Pour la pathogenèse des EHEC, le phage situé sur le chromosome code pour la shiga toxine et le plasmide 60-MDa code pour l'entérohémolysine et les fimbriae essentiels à la colonisation de la muqueuse épithéliale de l'intestin. Certaines souches possèdent l'îlot de pathogénicité LEE (Locus d'Effacement d'Entérocytes) et les lésions attachantes et effaçantes ont été observées aussi (Donnenberg et al., 1993).

#### **1.2.5 Les EIEC**

Ce pathotype cause des diarrhées invasives aqueuses chez l'homme, cliniquement identiques à la shigellose. L'invasion de l'épithélium du côlon par les EIEC comprend (i) la pénétration dans les cellules épithéliales (ii) la lyse des vacuoles d'endocytose (iii) la multiplication intracellulaire (iv) le mouvement vers le cytoplasme et (v) l'invasion des cellules épithéliales adjacentes (Goldberg et Sansonetti, 1993). En cas d'infection sévère, cette cascade d'événements provoque des colites inflammatoires invasives.

Comme les *Shigella spp*, ces souches contiennent un grand plasmide d'environ 230 kb qui porte les gènes requis pour l'invasion (Small et Falkow 1988) et qui codent pour un système de sécrétion de type III (Andrews et al., 1991; Faherty et Maurelli, 2009)

### **1.2.6 Les ETEC**

Le pathotype ETEC est à l'origine de diarrhées infantiles, les diarrhées chez les adultes et les diarrhées du voyageur dans les pays en développement où les conditions sanitaires sont inadéquates. Ces infections requièrent la colonisation des cellules par les facteurs de colonisation (CFs), la synthèse et la libération d'au moins un de deux groupes d'entérotoxines: LT (thermolabile) et ST (thermostable) (Qadri et al., 2005). L'humain n'est pas la seule cible des ETEC, les diarrhées dues aux ETEC sont parmi les maladies les plus fréquentes chez les porcelets et les veaux (Hariharan et al., 2004) et causent toujours des infections létales chez les animaux nouveaux-nés. Les ETEC sont à l'origine des pertes économiques énormes pour les industries agroalimentaires. La description détaillée de ce pathotype est présentée ci-dessous.

## **1.3 Les *Escherichia coli* enterotoxinogènes (ETEC)**

### **1.3.1 Généralités**

*Escherichia coli* entérotoxinogène (ETEC) est responsable d'un pourcentage élevé de diarrhées des nourrissons et de diarrhées du voyageur que l'on nomme aussi turista. Selon Rowe en 1970, le pic de son incidence correspondait au pic d'isolement d'*E.coli* O148K?H28, le sérotype qui n'avait jamais été isolé chez les sujets sains à l'époque (Rowe et al., 1970), mais il existe d'autres sérotypes actuellement importants.

Les ETEC sont l'une des causes majeures des diarrhées post-sevrages chez les porcs, responsables des pertes économiques suite à la mortalité, morbidité, diminution du taux de croissance et le coût des médicaments. Certains ETEC causent de la diarrhée sévère chez les veaux, les lapins et les agneaux (Smith et Halls, 1967).

Une stratégie de vaccination chez les porcs propose, entre autres, l'utilisation de souches vivantes d'*E.coli* exprimant les adhésines fimbriaires ou l'administration orale des fimbriae F4 (K88) purifiées par exemple (Fairbrother et al., 2005). Par contre, le traitement des formes sévères peut mettre en oeuvre la réhydratation orale et éventuellement les antibiotiques ou les antiseptiques intestinaux (Hariharan et al., 2004).

Les ETEC diffèrent des autres souches *E.coli* entraînant la diarrhée par deux facteurs: l'expression des toxines (LT et ST) et la présence des facteurs de colonisation (CFs) (Gaastra et Svennerholm, 1996). Ces deux facteurs sont codés et contrôlés par des gros plasmides et leur efficacité dépend des récepteurs membranaires des cellules hôtes.

### **1.3.2 Pathogenèse**

La pathogenèse des ETEC est représentée ci-dessous (Figure 2). Les bactéries sont ingérées par les animaux potentiellement sensibles et entrent dans le tube digestif (1). Il en résulte une colonisation de la muqueuse du jéjunum et/ou de l'iléon grâce aux adhésines fimbriaires se liant à des récepteurs spécifiques sur des entérocytes (2). Par la suite, les bactéries produisent les entérotoxines qui agissent au niveau des entérocytes pour y déclencher une fuite hydroélectrolytique dans la lumière intestinale (3). Finalement, ces toxines diminuent l'absorption d'eau ce qui donne lieu à une déshydratation, des diarrhées et une diminution de gain de poids et/ou la mort de l'animal (4).



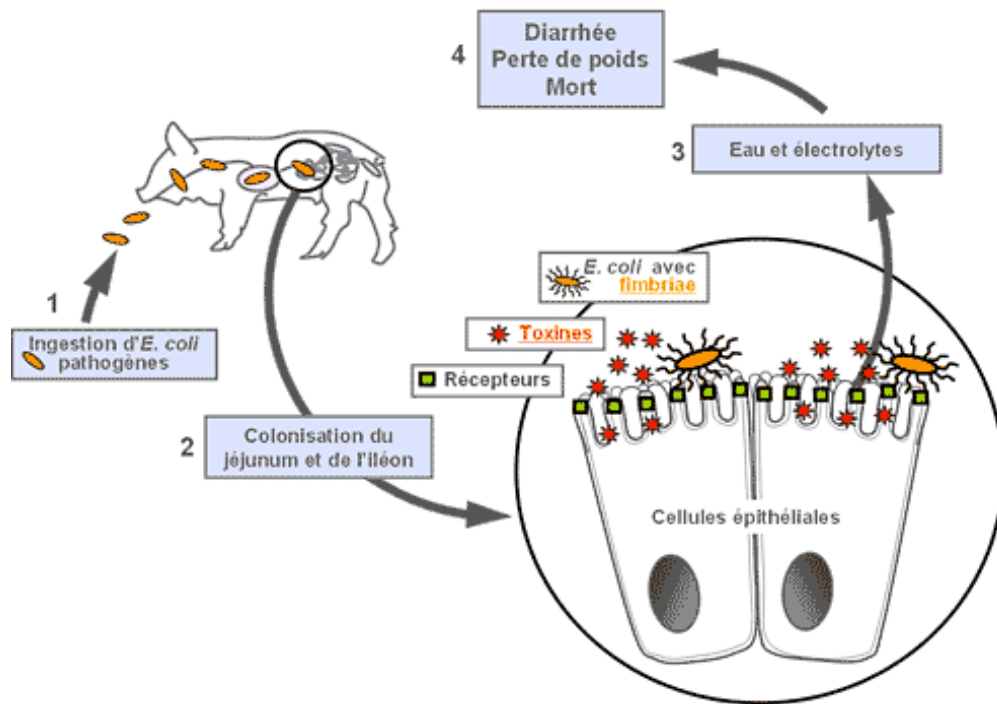


Figure 2: Mécanisme de pathogenèse des *E.coli* entérotoxinogènes chez le porc. Tiré de : ([www.ecl-lab.com](http://www.ecl-lab.com)).

### 1.3.3 Les facteurs de virulence.

De nombreux facteurs interviennent dans la pathogenèse des *E. coli* entérotoxinogènes comme pour les autres bactéries pathogènes. La combinaison d'un ensemble de facteurs serait selon leurs natures la cause des troubles variés. Les ETEC possèdent des facteurs importants de colonisation: les fimbriae, leur permettant de se fixer sur les entérocytes de l'intestin grêle et de résister au processus d'élimination du péristaltisme intestinal. Les ETEC produisent également les entérotoxines, soit thermolabiles (LT) ou thermostables (ST) qui sont à l'origine de la diarrhée aqueuse. Les fimbriae et les entérotoxines des ETEC d'animaux sont codés par des plasmides.

### 1.3.3.1 Les fimbriae

Les fimbriae exprimés par les ETEC sont des structures protéiques qui prennent naissance dans la membrane externe des cellules bactériennes. Les fimbriae sont formés par deux sous-unités: majeure et mineure. Ces facteurs de colonisation jouent un rôle dans l'attachement et surviennent dans la colonisation de la muqueuse intestinale, étapes précoces dont l'implication avec d'autres facteurs de virulence aboutit à l'infection de l'hôte (Cassels et Wolf, 1995).

Plus de 22 facteurs de colonisation (CFs) sont reconnus chez les ETEC humains, désignés comme "coli surface" (CS) dont on distingue différentes familles: colonisation factors-I (CFA/-I, CS1, CS2, CS4, CS14, CS17), Coli Surface-5 (CS5, CS7, CS18, et CS20) et d'autres uniques (CS3, CS6 et CS10 à CS12) (Qadri et al., 2005).

Quant aux principaux facteurs d'adhésion des ETEC animales qui engendrent la diarrhée néonatale, on peut citer les fimbriae F4, F5, F6, F41, F18ab et F18ac communément désignés par les antigènes de surface K88, K99, 987P, F41, F107, 2134P, respectivement dans l'ancienne nomenclature (Nagy et Fekete, 1999).

La nouvelle nomenclature sera utilisée dans le reste du mémoire. Les fimbriae confèrent la spécificité de l'espèce pour le pathogène, par exemple les ETEC qui expriment les fimbriae F5 et F6 infectent les veaux et les porcs nouveaux-nés, alors que celles exprimant F4 ne sont pathogènes que pour les porcs. Les 3 variants du fimbriae F4 (F4ab, F4ac et F4ad) ont été décrits et ont permis d'identifier 6 phénotypes porcins en fonction des variants qu'ils lient. Le phénotype A (lie les 3 variants), le phénotype B (lie les variants F4ab et F4ac), le phénotype C (lie les variants F4ab et F4ad), le phénotype D (lie le variant F4ad), le phénotype E (lie aucun des variants) et le phénotype F (lie le variant F4ab). Les récepteurs pour ces phénotypes ont été caractérisés et on distingue les récepteurs bcd, bc, d, et b dans les phénotypes A, A et B, C et D et F, respectivement (Van den Broeck et al., 2000).

Les souches entérotoxinogènes porcines sont divisées en deux groupes: celui qui produit ST seulement et l'autre qui produit les deux (ST et LT). L'antigène F4 est associé aux souches qui produisent deux entérotoxines, tandis que les adhésines F6 et F5 détectées sur les souches entérotoxinogènes sont en association avec les souches produisant les enterotoxines stables (Gaastra et De Graaf, 1982). Le fimbriae F18 et le fimbriae F4 sont associés à la diarrhée chez les porcelets sevrés (Fairbrother et al., 2005).

### **1.3.3.2 Les entérotoxines**

Par l'action des entérotoxines thermolabiles (LT) de haut poids moléculaire ou thermostable (ST) ayant un poids moléculaire faible codées sur les plasmides, les souches ETEC stimulent une sécrétion intestinale, diminuant aussi l'absorption de NaCl (Sears et Kaper, 1996). Ces deux entérotoxines sont exprimées indépendamment l'une à l'autre, mais peuvent également être exprimées par une souche ETEC en même temps. Les entérotoxines des souches entérotoxinogènes animales sont classées en: entérotoxines thermolabiles (LTh-I, LTp-I, LTIIa, LTIIb et LTIIc) et entérotoxines thermostables (STaH, STaP et STb) (Nagy et Fekete, 1999), EAST-1 étant aussi une entérotoxine thermostable retrouvée chez les ETEC. La toxine STa est associée aux diarrhées humaines et animales contrairement à STb qui est quasi exclusivement liée aux diarrhées porcines.

#### **1.3.3.2.1 LT**

L'entérotoxine thermolabile est une toxine protéique composée de six sous-unités : la sous-unité A qui joue un rôle enzymatique et cinq sous-unités B assurant l'attachement de la toxine à son récepteur ganglioside GM1 à la membrane (Sixma et al., 1993). La structure de LT ressemble à celle de la toxine choléra (CT) exprimée par *Vibrio cholerae*. LT et CT partagent plusieurs caractéristiques telles que la similitude de leur séquence protéique, l'identité des récepteurs les plus importants, l'activité enzymatique, etc.

On distingue deux sérogroupes : LT-I et LT-II. LT-I est exprimée par les souches pathogènes chez les animaux et humains contrairement à LT-II qui est principalement retrouvée dans les souches pathogènes chez les animaux, rarement chez les souches humaines (Seriwatana et al., 1988). Les gènes codant LT (*elt* ou *etx*) sont situés sur les plasmides pouvant coder également ST et/ou les facteurs antigéniques de colonisation (CFAs).

La toxine LT est fixée à son récepteur, internalisée dans la cellule et transportée vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Bastiaens et al., 1996). La sous-unité A est clivée, donnant le domaine A1 actif qui migre vers la membrane basolatérale via le cytoplasme. Ce domaine modifie la sous unité  $\alpha$  de la protéine  $G_s$ , une protéine liant le GTP et régulant l'activité de l'adénylate cyclase (AC). L'adénylate cyclase est activée et produit l'AMPc, dont l'augmentation intracellulaire conduit à l'activation de la protéine kinase A AMPc-dépendante (PKA). La PKA phosphoryle à son tour un domaine du canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) situé dans la membrane apicale. Il y a ensuite une sortie d'ions chlorures et d'eau dans la lumière intestinale, associée à une diminution de l'entrée de sodium et d'eau dans les cellules, conduisant à une diarrhée aqueuse (Figure 3).

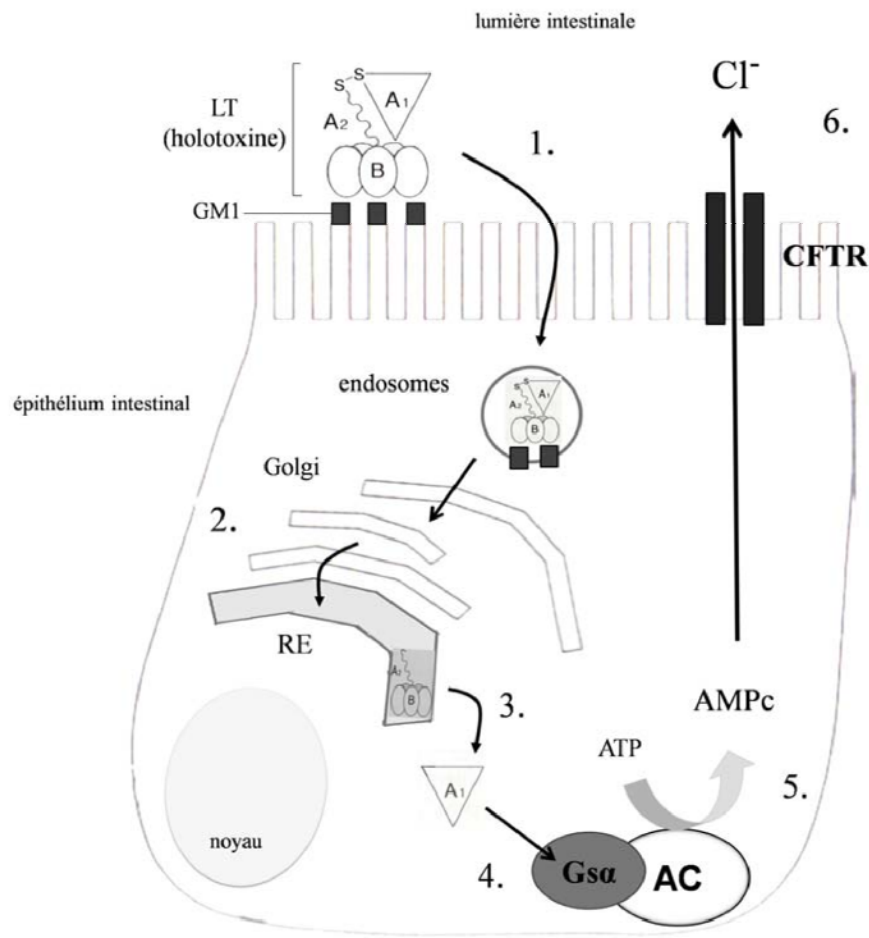


Figure 3: Circuit et effets intracellulaires de l'entérotoxine LT. (1) fixation au récepteur membranaire GM1 et internalisation récepteur-dépendant dans les endosomes; (2) transfert vers le réticulum endoplasmique (RE) *via* l'appareil de Golgi; (3) clivage du domaine A1 dans la lumière du RE et translocation dans le cytoplasme; (4) au pôle basal des entérocytes, fixation covalente du domaine A1 à la protéine G $\alpha$  régulant l'adénylate cyclase (AC); (5) activation constitutive de l'adénylate cyclase et augmentation des concentrations cytoplasmiques d'AMPc; (6) activation du canal membranaire CFTR et sécrétion d'ions Cl<sup>-</sup> et d'eau, causant la diarrhée. Adapté de Hirst et D'Souza, 2006.

#### 1.3.3.2.1.1 LT-I

La toxine LT-I est formée par la sous-unité A de 28 kDa et cinq sous-unités B de 11,5 kDa (Streatfield et al., 1992). Les sous-unités B s'arrangent sous forme d'un anneau, et l'oligomérisation des sous-unités B ainsi que la formation du complexe stable de la toxine (AB<sub>5</sub>) sont influencés par les domaines de la sous-unités A reliés par un pont disulfure : A1 pour l'activité ADP ribosyl transférase et A2 qui attache A1 à la sous-unité B.

LT-I se lie fermement aux gangliosides GM1, mais se lie faiblement aux gangliosides GD1b, GD2 et GM2 (Teneberg et al., 1994). Et pourtant, quelques glycoprotéines intestinales servent aussi de récepteurs. Les deux variants LTp (LTp-I) et LTh (LTh-I) ont été découverts dans des souches isolées chez les porcs et les humains, respectivement.

#### 1.3.3.2.1.2 LT-II

La sous-unité A du sérotype LT-II ressemble 55-57% à la sous-unité A du sérotype LT-I et CT sans aucune homologie avec la sous-unité B. Les deux variants antigéniques LT-IIa et LT-IIb ont été caractérisés (Pickett et al., 1989). À ce jour, on a découvert un nouveau type de toxine thermolabile (LT-IIc), encodé par des *E.coli* entérotoxinogènes isolées chez les aviaires. LT-IIc est moins toxique comparativement à CT, LT-IIa et LT-IIb et sa toxicité est partiellement neutralisée par les anticorps anti- LT-IIa et anti- LT-IIb mais pas les anti-CT (Nawar et al., 2010).

CT et LT-I ont une grande affinité pour les gangliosides GM1 alors que LT-IIa se lie fortement aux gangliosides GD1b, mais peut lier aussi GD1a et GM1 de façon faible. Quant à LT-IIb, elle a une forte affinité pour GD1a (Arce et al., 2005).

### **1.3.3.2.2 Les toxines thermostables**

#### **1.3.3.2.2.1 Généralités**

Les toxines thermostables sont des peptides monomériques qui contiennent plusieurs cystéines assurant la stabilité de ces toxines par la formation des ponts disulfure. Il existe deux classes de toxines thermostables qui diffèrent selon leur structure et mécanisme d'action: STa et STb. La toxine STa est produite par les ETEC, et quelques ETEC peuvent exprimer aussi la toxine EAST1 des EAEC dont l'homologie protéique du site actif avec STa est de 50%.

#### **1.3.3.2.2.2 La toxine STa**

Initialement, la toxine STa est produite comme un précurseur pro-STa de 72 acides aminés, puis clivée entre les acides aminés 19 et 20 quand elle traverse la membrane interne vers le périplasme. Le peptide pro-STa de 53 acides aminés est détecté dans le périplasme et est clivé dans le milieu extracellulaire pour donner lieu à la forme mature de STa de 18 ou 19 acides aminés (Rasheed et al., 1990).

Deux variants nommés STp (ST porcin) et STh (ST humain) ont été découverts dans les souches isolées chez les porcs et les humains, respectivement, mais tous les deux peuvent se retrouver dans les souches ETEC humaines. Les deux variants sont quasiment identiques pour 13 résidus responsables de l'activité entérotoxique, dont six d'entre eux sont des cystéines. La forme mature relarguée à l'extérieur de la cellule contient trois ponts disulfures intramoléculaires (Yamanaka et al., 1994). Pour le mécanisme d'action de STa (Figure 4), son architecture moléculaire est sous forme d'un hexamère en anneau qui est impliqué dans l'activation de son récepteur, la guanylate cyclase (Sato et Shimonishi, 2004).

La liaison de STa sur son récepteur GC-C (guanylate cyclase C) stimule l'activité guanylate, augmentant la concentration intracellulaire de cGMP, qui stimule à son tour la sécrétion de chlore suite à l'activation du canal de chlore (CFTR) et inhibe l'absorption de NaCl ce qui entraîne une fuite nette du liquide intestinal et donc la diarrhée (Sears et Kaper, 1996).

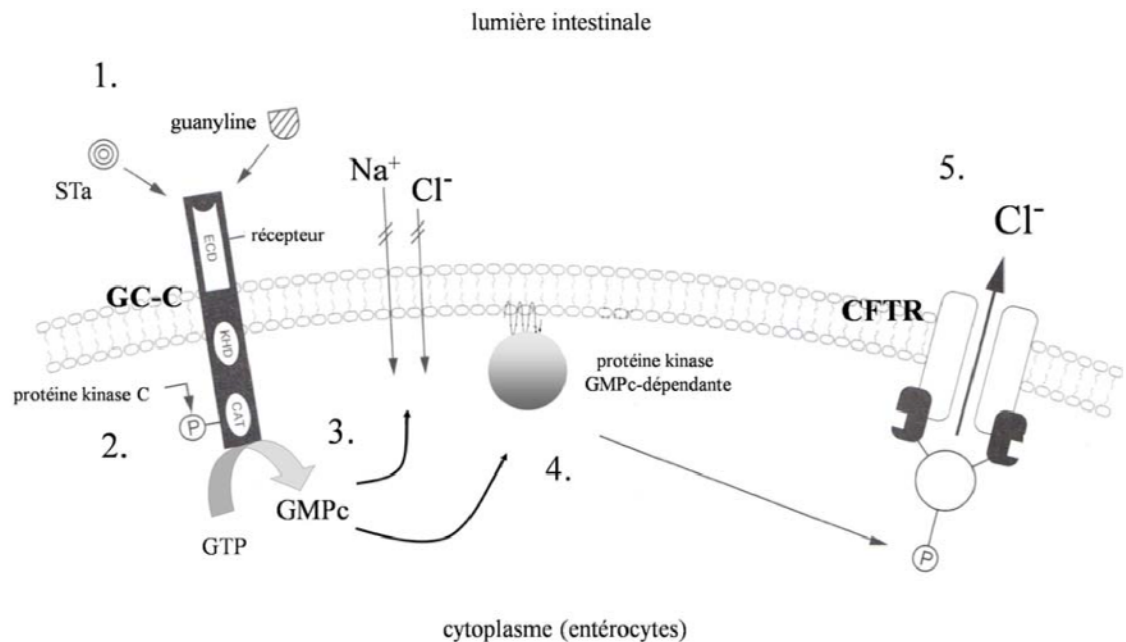


Figure 4: Effets cellulaires de l'entérotoxine STa et du peptide endogène guanyline. (1) interaction de STa ou de la guanyline avec le domaine extracellulaire (ECD) de la guanylate cyclase C (GC-C); (2) activation du domaine protéine-kinase C et phosphorylation du domaine catalytique (CAT); (3) production de GMPc et diminution de l'influx de Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>; (4) activation d'une protéine kinase GMPc-dépendante et phosphorylation intracellulaire du canal CFTR; (5) sécrétion accrue d'ions Cl<sup>-</sup> dans la lumière intestinale, menant à la diarrhée. Adapté de Dubreuil, 2006b.



## 1.4 La toxine STb

### 1.4.1 Généralités

La toxine STb est principalement associée aux ETEC isolées des porcs, mais quelques ETEC humaines et d'autres animaux expriment également la toxine STb. Zhang (Zhang et al., 2007), a montré que 72,6% de 304 *E.coli* isolés chez les porcs diarrhéiques aux États-Unis possèdent le gène de STb ce qui indique la prédominance de cette toxine.

La séquence protéique de STb ne ressemble pas à celle de la toxine STa. Contrairement à la toxine STa, la toxine STb est insoluble dans le méthanol et inactive dans les souriceaux mais active dans les porcelets nouveaux-nés et sevrés (Newsome et al., 1978). Selon Arriaga et al., (1995) STb contient 4 résidus cystéines qui forment 2 ponts disulfures ayant pour rôle de stabiliser la toxine, d'assurer la sécrétion et la toxicité de cette dernière.

La toxine STb est pauvrement immunogène. On obtient les anticorps lorsqu'on couple la toxine à une protéine de fusion et ces anticorps peuvent neutraliser effectivement la toxicité de STb (Dubreuil et al., 1996). La toxine STb est sensible aux enzymes de type trypsine et est résistante à la chaleur (Dubreuil et al., 1991).

### 1.4.2 Génétique

Le gène *estB* qui code pour la toxine STb est retrouvé sur des plasmides hétérogènes. Ces plasmides portent d'autres gènes codant pour d'autres entérotoxines, l'antigène K99, la résistance aux antibiotiques, la production de colicine. La plupart de ces propriétés sont cotransférées (Harnett et Gyles, 1985). Il existe des séquences répétées inversées aux extrémités du gène *estB* dans le plasmide P307. Celles-ci confirment que ce gène fait partie d'un transposon (Tn4521), dont la taille est de 9 kb. La structure du gène *estB* est uniforme, par contre les séquences flanquantes sont hétérogènes ce qui suggère que le gène *estB* n'est pas toujours localisé dans le même transposon (Lee et al., 1985).

Il semble que la transposition du gène *estB* est un mécanisme par lequel les facteurs de virulence sont répandus à travers les ETEC (Dubreuil, 1997). Spandau et Lee (1987) démontrent que le gène de STb est régulé par un promoteur relativement faible expliquant la présence de faible quantité de STb produite par les diverses souches d'*E. coli*.

### 1.4.3 Biogenèse

Le polypeptide STb est synthétisé comme un précurseur de 71 acides aminés (Lee et al., 1983). La partie N-terminale de pro-STb (résidus 1-23), constitue une séquence signal et est clivée par une peptidase signal lors de l'exportation du pro-STb dans le périplasma. Deux ponts disulfures sont alors formés dans le périplasma par la protéine périplasmique DsbA et le STb périplasmique est transloquée dans le milieu extracellulaire (Sukumar et al., 1995), (Fig 5).

La formation de ces ponts disulfures est essentielle pour la sécrétion de la toxine, étant donné que les mutants de la toxine où les ponts disulfures ne sont pas formés ont été transportés mais ont subi la protéolyse périplasmique (Lawrence et al., 1992).

La forme active de la toxine STb passe à travers le canal TolC formé par une protéine membranaire TolC vers l'extérieur. Les mutations dirigées des différents gènes de transporteurs, situés à l'intérieur de la membrane (*acrAB*, *acrEF*, *emrAB*, *emrKY*, *mdtEF*, *macAB* et *yojHJ*) montrent que la sécrétion de STb diminue largement lorsque le gène *macAB* est muté donnant lieu à l'accumulation de la toxine dans le périplasma.

Depuis, on conclut que MacAB coopère avec TolC et on propose que le système MacAB-TolC capte la toxine STb périplasmique et l'exporte à l'extérieur de la cellule (Yamanaka et al., 2008).

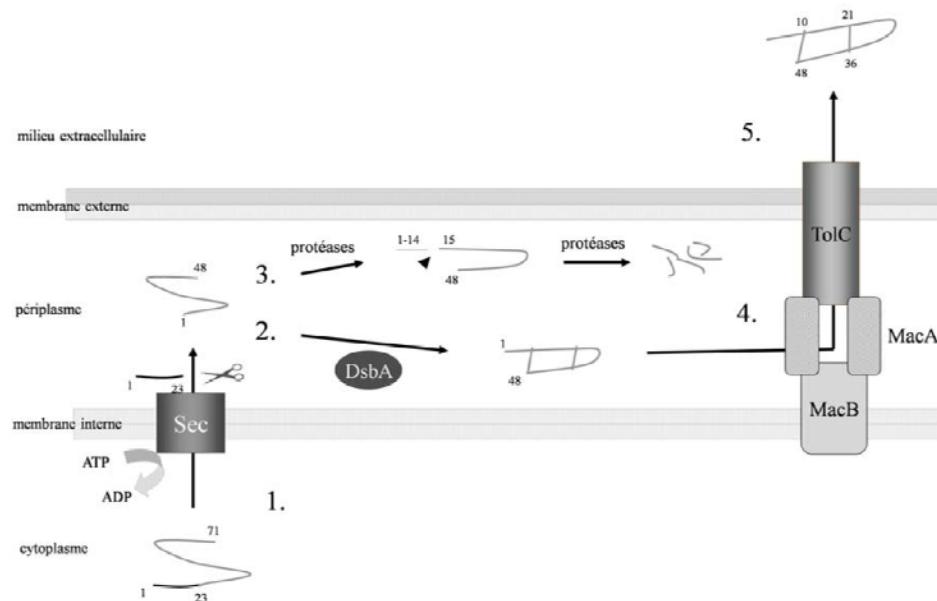


Figure 5: Biogénèse et sécrétion de STb : modèle actuellement proposé. (1) translocation dans le périplasma du précurseur de 71 a.a. par le système Sec suivi du clivage de la séquence signal N-terminale de 23 a.a; (2) formation des deux ponts disulfures par l'oxydoréductase périplasmique DsbA et repliement du peptide; (3) dégradation du peptide en cas de non-formation des ponts disulfures ou de mauvais appariement des cystéines par des protéases périplasmiques de type trypsine. Les a.a. 14- 15 constituent une cible d'initiation de la digestion par les protéases; (4) transfert du peptide correctement formé au système MacAB dans la membrane interne; (5) export vers le milieu extracellulaire après passage par le canal de membrane externe TolC. Adapté des références suivantes : Kupersztoch *et al.*, 1990 ; Foreman *et al.*, 1995 ; Okamoto *et al.*, 1995 ; Yamanaka *et al.*, 2008.



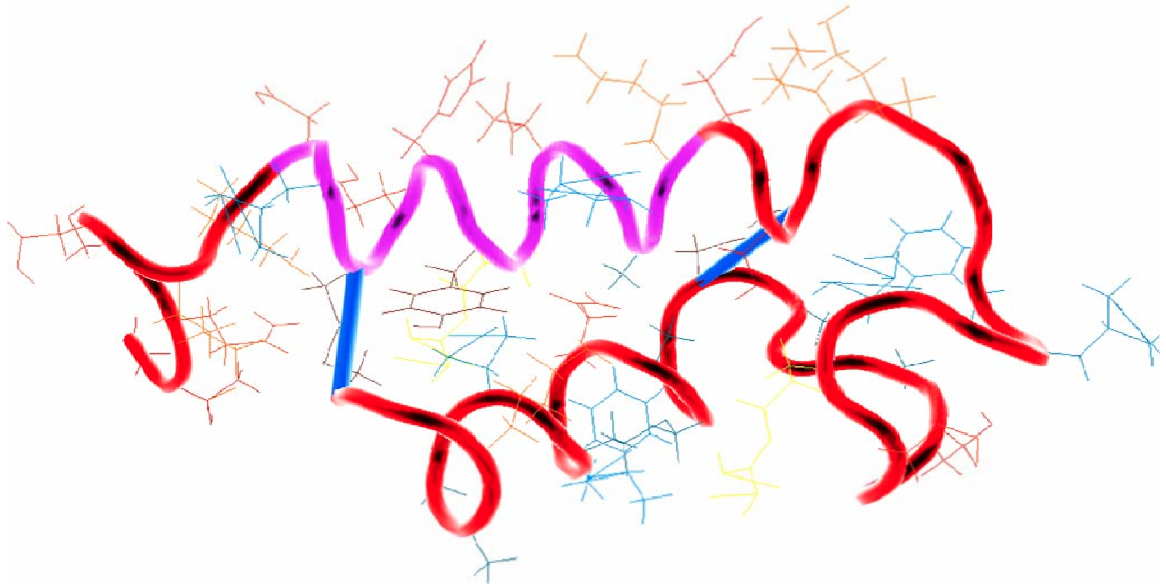


Figure 7: Structure tridimensionnelle de la toxine STb (Sukumar et al., 1995)

#### 1.4.5 Zonula Occludens Toxin (ZOT), STb et Zonuline

La toxine ZOT est une entérotoxine de 399 acides aminés élaborée par *V.cholerae*. Elle possède 3 parties : une partie N-terminale (1-225 aa), une région transmembranaire (226-246) et une partie C-terminale de 153 résidus, qui joue un rôle dans la perméabilisation des protéines des jonctions serrées (Schmidt et al., 2007). La zonuline étant une protéine endogène retrouvée dans l'intestin de l'homme, son rôle est d'assurer le remodelage des jonctions serrées. L'analyse structurale de la partie N-terminale de la zonuline et la partie C-terminale de ZOT met en évidence un motif commun de 8 acides aminés dont 4 acides aminés sont identiques entre ces deux molécules (Tableau 1). Ce motif est important pour la liaison de ZOT au récepteur de la Zonuline. Le récepteur de zonuline est une glycoprotéine de 45 kDa qui contient de multiples résidus d'acides sialiques, ressemblant au myéloïde, membre de la famille des protéines liant le calcium (Lu et al., 2000). Ainsi le domaine de liaison au récepteur dans la séquence de STb montre un motif de 8 acides aminés semblable au motif de liaison au récepteur de ZOT, dont 5 acides aminés sont identiques.

Tableau 1: Comparaison des séquences de la zonuline, ZOT et STb

Molécule	Acides aminés ( numéro)															
	290				295				300							
ZOT			F	C	I	G	R	L	C	V	Q	D	G	F	V	T
STb	20				25				30				35			
	A	K	E	S	C	K	K	G	F	L	G	V	R	D	G	T A G A
Zonuline	5				10				15				20			
	M	L	Q	K	A	E	S	G	G	V	L	V	Q	P	G	X S N R L

#### 1.4.6 Variants de STb

Les gènes codant pour les toxines STa et STb font partie des transposons Tn1681 et Tn4521, respectivement. Ces gènes sont retrouvés sur un fragment de 10 kb approximativement, “toxin-specific locus” (TSL) isolé d’un plasmide pTC d’une souche porcine ETEC 2173 produisant les fimbriae F18 qui a été décrite (Fekete et al., 2003). Pour la première fois, un variant de la toxine STb fut découvert dans notre laboratoire. Des 100 souches STb-positives analysées, 23 possédaient le gène de la toxine avec une modification dans la séquence génétique: une asparagine présente en position 12 remplaçant l’histidine (Taillon et al., 2008). Ce variant est répandu dans les populations de souches ETEC du Québec. On supposait que ce variant a des caractéristiques biologiques altérées par rapport à la toxine sauvage mais l’analyse par dichroïsme circulaire a montré que le variant et la toxine sauvage ont une structure secondaire ainsi qu’une stabilité semblables. Son affinité pour son récepteur, le sulfatide, est légèrement inférieure comparativement à celle de la toxine sauvage. L’internalisation du variant est un peu plus élevée vis-à-vis de la toxine sauvage. Ceci suggère que le variant est structuellement et biochimiquement comparable à la toxine sauvage. Par contre, l’étendue de ce variant ainsi que son implication dans la diarrhée porcine ne sont pas connues (Taillon et al., 2012).

## **1.4.7 Mécanisme d'action**

### **1.4.7.1 Oligomérisation**

La toxine STb est capable de former des hexamères et des heptamères en présence ou en absence de son récepteur. Ces hexamères et heptamères sont formés par l'interaction des hélices- $\alpha$  hydrophobes en C-terminale de monomères de STb, comme l'a démontré l'étude de mutagenèse de cette région (Labrie et al., 2001b). L'oligomérisation n'est pas observée dans les conditions réductrices avec le bêta-mercaptoéthanol, ce qui prouve la nécessité de l'intégrité de la structure de STb pour ce processus d'oligomérisation (Labrie et al., 2001a).

### **1.4.7.2 Récepteur**

L'attachement de la toxine à des cellules épithéliales est l'étape primordiale pour stimuler la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale des animaux (Labrie et al., 2001b). L'oligomérisation est nécessaire pour sa fixation au récepteur et à la toxicité induite par STb.

La toxine STb se lie au sulfatide retrouvé sur la surface des cellules épithéliales intestinales, qui représente le récepteur fonctionnel de cette toxine (Rousset et al., 1998). Le sulfatide ( $\text{SO}_3^-$  3galactosyl $\beta$ 1céramide) est un glycosphingolipide acide composé d'un céramide lié à un galactose sulfaté en position 3. Le sulfatide est situé dans les cellules du tube gastro-intestinal, du rein, de la rate (Beausoleil et al., 2002).

Le galactose lié au groupe sulfate en position 3 est essentiel pour la liaison spécifique de STb (Rousset et al., 1998). Pour moduler l'entérototoxicité, STb interagit avec différents lipides membranaires plutôt que des protéines ou les glycoprotéines (Chao et Dreyfus, 1999). Une forte affinité entre la toxine et le sulfatide est confirmée par la constante de dissociation de  $2.4 \pm 0.61$  nM qui a été déterminée par résonance plasmonique de surface (Gonçalves et al., 2008).

#### **1.4.7.3 Perméabilisation membranaire et internalisation.**

Selon une étude réalisée sur des vésicules de la membrane des cellules épithéliales de la bordure en brosse du jéjunum porcin, la toxine STb est capable de perméabiliser la membrane par la formation de pores non-spécifiques, d'une façon saturable et dose-dépendante (Goncalves et al., 2007). Elle permet également la pénétration des colorants vitaux tel que le bleu de Trypan dans les différentes lignées cellulaires dépendamment de la dose, sans toutefois affecter leur viabilité (Beausoleil et al., 2002).

Plusieurs travaux ont été effectués sur l'internalisation de STb dans les cellules, le processus primordial pour induire la sécrétion des fluides. L'association de la toxine marquée à l'iode radioactif (iode-125) avec les cellules intestinales humaines HT29 et T84 a été mise en évidence. Le traitement de ces cellules par une solution acide isotonique enlève approximativement 55% +/- 10% de la toxine, suggérant que la moitié de STb est fortement associée à la membrane et/ou internalisée. L'analyse par immunofluorescence confirme ainsi la présence de la toxine au niveau de la membrane et dans le cytoplasme (Chao et Dreyfus, 1997). Un essai avec un anticorps anti-STb marqué à l'or suivi d'une visualisation en microscopie électronique démontre l'attachement de STb aux cellules épithéliales de l'intestin du rat. La protéine de fusion MBP-STb et STb ont été internalisées (Labrie et al., 2002).

#### **1.4.7.4 Modèle proposé du mécanisme d'action de STb**

Lors d'une interaction entre STb avec des cellules intestinales, la toxine s'oligomérisse en hexamères et heptamères qui se lient au sulfatide implanté dans la membrane des cellules épithéliales intestinales, par interaction de la boucle flexible de la toxine et du galactose sulfaté en position 3 du sulfatide. Ces oligomères forment des pores membranaires perméables aux différents cations, puis la toxine est internalisée. À l'intérieur des cellules, STb déstabilise le potentiel mitochondrial et active la protéine Gai3 couplée à un canal calcique membranaire (Dreyfus et al., 1993).



Ceci entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire des ions calciums et ces ions activent une protéine kinase II  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline-dépendante (CaMKII) (Fujii et al., 1997). La protéine kinase C et le CFTR sont à leur tour activés aussi et l'augmentation du calcium intracellulaire initie la régulation des phospholipases A2 et C, qui libèrent l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est à la base de la formation de  $\text{PGE}_2$  et 5-HT aboutissant à l'ouverture d'un ou plusieurs canaux ioniques membranaires. Les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  sécrétés entraînent la perte d'eau et mènent à la diarrhée.

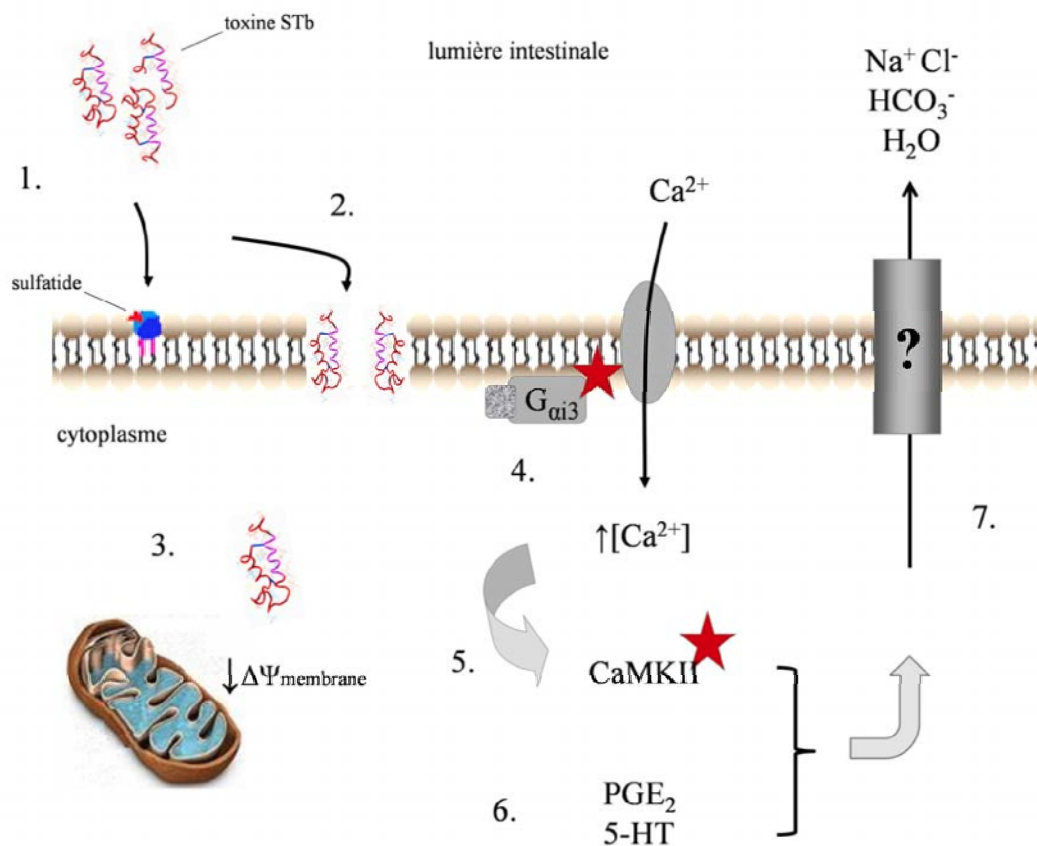


Figure 8: Mécanisme d'action proposé de la toxine STx. (1) Oligomérisation de la toxine et liaison au sulfatide membranaire des entérocytes;

(2) formation de pores non spécifiques perméables aux cations ; (3) internalisation de la toxine et déstabilisation du potentiel mitochondrial; (4) activation d'une protéine *Gai3* couplée à un canal calcique membranaire et augmentation de la concentration en ions calcium dans le cytoplasme; (5) activation d'une protéine kinase II  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline-dépendante (CaMKII); (6) libération de prostaglandine E2 (PGE2) à partir des phospholipides membranaires, et de sérotonine (5-HT) par les cellules entérochromaffines; (7) ouverture de canaux ioniques membranaires indéterminés et sécrétion d'ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  menant à la diarrhée. Adapté de Dubreuil, 2006a; Dubreuil, 2008.

#### 1.4.8 Intérêt clinique

La toxine STb est associée à la virulence des souches ETEC qui infectent le porc, plus particulièrement celles qui causent des diarrhées post-sevrages et des colibacilloses porcines. L'activité biologique de STb a été observée dans le jéjunum des rats, souris, veaux et des lapins, mais également chez d'autres espèces comme le chien, poulet, furet et les bovins (Whipp, 1991; Akashi et al., 1993).

En plus de STb, la majorité des souches ETEC expriment également les autres toxines (Moon et al., 1986) et présentent une large combinaison de différents gènes qui codent pour les fimbriae (voir le tableau 2). Généralement les souches ETEC porcines expriment les fimbriae F4 ou F18 avec les entérotoxines LT et/ou ST (STa et STb). Cependant, la toxine EAST1, AIDA-I (Adhesion Involved in Diffuse Adherence) et PAA (Porcine Attaching and effacing-Associated factor) peuvent être exprimés par les souches ETEC associées aux diarrhées (Zhang et al., 2007). Donc, il est difficile de déterminer l'effet réel de STb, ce qui suppose que STb joue un rôle complémentaire aux autres toxines. Le gène *estB* codant pour la toxine STb est le plus abondant dans les souches ETEC isolées de porcs souffrant de diarrhée. Par contre, ce gène n'est pas fréquent dans les souches ETEC d'origine humaine et rarement associé aux diarrhées humaines (Urban et al., 1990). Le gène codant pour la toxine est retrouvé également dans les souches isolées chez les bovins en Belgique. L'hybridation de colonies par une sonde d'ADN pour les entérotoxines

STaP, STaH, STb, LT et pour les adhésines K99, F41, K88, 897P déterminent les différents pathotypes prédominants : 2 pathotypes majeurs (STaP+K99+F41+/STaP+K99+), sauf que 3 pathotypes mineurs (STap+/ STb+F41+/K99+F41+) ont été mis en évidence dans 5% des souches qui complémentaient avec la sonde (Mainil et al., 1990).

L'analyse par PCR confirme une combinaison de divers facteurs de virulence dans les souches isolées des porcs atteints de diarrhée : le pathotype F4+STa+STb+LT+ est le plus rencontré au Canada et au Vietnam alors que les pathotypes F18+STa+ STb+STx2e+, F4+LT+STb+ et F4+LT+ST+EAST1+ sont plus fréquents aux États-Unis (Vidotto et al., 2009).

Un total de 60% des porcs inoculés avec un mutant LT-( $\Delta$ eltAB), dont le pathotype est F4+ LT- STb+ EAST1+ ont développé une diarrhée sévère et une septicémie comparativement à 100% des porcs avec une souche F4+ LT+ STb+ EAST1+. Ces résultats confirment le rôle de LT dans la pathogénécité des souches ETEC et démontrent que les toxines LT, STb et EAST1 sont exprimées conjointement par les souches ETEC porcines (Berberov et al., 2004)

Tableau 2 : Distribution des gènes des fimbriae et d'enterotoxines dans les souches *E. coli* isolées chez les porcelets diarrhéiques (Vidotto et al., 2009).

Adhesins	N° of strains	STa	STb	LT	STa STb	STa LT	STb LT	STb STx2e	STa STb LT	None toxin
F4	4			2			2			
F18	2		1	1						
F5	1			1						
F6	2					2				
F41	2						1		1	
F4 + F5	3			3						
F4 + F18	1		1							
F4 + F41	1			1						
F5 + F6	1				1					
F5 + F18	2							2		
F6 + F18	2						2			
F18, F41	1	1								
F4+F5+F6	3			1		1			1	
F4+F6+F18	2			1	1					
F4+F6+F41	2	1	1							
F4, F18, F41	8	1			1	1			5	
F4+F6+F18	2					1			1	
F5+F6+F41	1			1						
F5+F18+F41	2					2				
F4+F5+F6+F18	2								2	
F4+F5+F6+F41	2						1			1
F4+F5+F18+F41	6	2	1						3	
F4+F6+F18+F41	3					1	1	1		
F4+F5+F6+F18+F41	5				1				4	
None	40	1	3	17		3	6		2	8
Total	100	6	9	28	5	11	13	3	19	9

#### 1.4.9 Le développement des vaccins

La toxine LT est communément utilisée dans l'élaboration de vaccins, mais STb n'est pas exploitée à cause de sa faible immunogénicité. Un mutant non toxique de la toxine LT (LT<sub>192</sub>) dérivée des ETEC porcines a été fusionné avec STb. La fusion LT<sub>192</sub>-STb augmente le pouvoir immunogène de STb et les anticorps anti-LT et anti-STb sont produits. Cette fusion pourrait alors jouer un rôle dans le développement des vaccins contre les souches ETEC porcines causant des diarrhées (Zhang et al., 2010).

De même, la toxine STa (STa 11 :N-K, STa12 :P-F, STa13 :A-Q) devient antigénique lorsqu'elle est fusionnée avec pLT192(R-G) et déclenche la formation des anticorps anti-LT et anti-STa protecteurs capables de neutraliser les toxines LT et la toxine CT du *V. cholerae* purifiées (Zhang et al., 2010).

Le vaccin courant contre les souches ETEC est basé sur les facteurs de colonisation et la sous-unité B de la toxine thermolabile (LTB), vu que les toxines thermostables (STa et STb) sont peu immunogènes. L'immunisation des souris avec une entérotoxine de fusion STa-LTB-STb entraîne une augmentation significative des anticorps anti-LTB, anti-STa, anti-STb dans le sérum. Ceci suggère que les déterminants antigéniques de ces entérotoxines sont conservés dans la toxine hybride et la mortalité des souris immunisés a fortement diminué comparativement aux souris contrôles. Ces résultats montrent que la fusion trivalente d'entérotoxines STa-LTB-STb est une base potentielle pour développer un vaccin contre les diarrhées induites par les souches ETEC (You et al., 2010 ).

## **2. Les jonctions intercellulaires**

### **2.1 Les cellules épithéliales**

L'épithélium intestinal est formé par des entérocytes tapissés de microvillosités, augmentant la surface d'absorption de la muqueuse intestinale.

Ces microvillosités sont maintenues par une armature de microfilaments au centre qui s'insère dans la barre terminale. Les chaînes glucidiques de glycoprotéines et de glycolipides constituent le glycocalyx et se fixent sur la surface membranaire des microvillosités. Leur structure permet la reconnaissance d'un très grand nombre de signaux tels que les hormones, bactéries, toxines et virus, et de capter l'information et de la transmettre à l'intérieur de la cellule.

Les cellules épithéliales interagissent fortement entre elles par un système de jonctions intercellulaires. Ces jonctions permettent de maintenir une cohérence mécanique et chimique ce qui donne lieu à une véritable frontière entre la lumière intestinale et le milieu intérieur. On distingue les jonctions macula et zonula selon que leurs dispositifs sont localisés et diffus, respectivement. Il existe quatre types de jonctions intercellulaires différentes par leurs structures protéiques et fonctions : desmosomes/hémidésmosomes (macula adherens), jonctions intermédiaires (zonula adherens), jonctions serrées (zonula occludens), jonctions communicantes (macula occludens). Seules les jonctions serrées seront décrites en détail dans la section suivante.

Tableau 3: Les différents types de jonctions intercellulaires des cellules épithéliales et leurs caractéristiques.

Nom	Largeur	Cytosquelette	Rôle
Desmosomes / Hémidésmosomes ( <i>Macula adherens</i> )	25 à 35 nm	Filaments intermédiaires chez les vertébrés Microtubules chez les invertébrés.	Solidité mécanique et répartition des forces dans les épithéliums
Jonctions intermédiaires ( <i>Zonula adherens</i> )	25 à 35 nm	Actine-myosine	Cohésion des tissus épithéliaux et rôle morphogénétique
Jonctions serrées / Tight Junctions ( <i>Zonula occludens</i> )	0	Actine-myosine	Assure l'étanchéité des épithéliums entre deux compartiments tissulaires
Jonction communicantes / Gap junctions ( <i>Macula occludens</i> )	2 nm (vertébrés) 4 nm (invertébrés)	Aucun	Assure la communication entre le cytoplasme de deux cellules, couplage électrique entre cellules

## 2.2 La barrière épithéliale

Une barrière épithéliale délimite l'interface entre l'environnement et l'organisme, contribuant à l'homéostasie générale. Par exemple la barrière épithéliale de la peau (épiderme) est la barrière biologique la plus imperméable du corps, prévenant des agressions et des infections tout en assurant une homéostasie de la température corporelle (Furuse et al., 2002).

Quant à la barrière épithéliale intestinale, elle joue un rôle beaucoup plus complexe car elle doit défendre l'organisme contre l'environnement hostile mais aussi assurer le transport actif et passif. Le passage de la barrière épithéliale intestinale (perméabilité intestinale) emprunte 2 voies : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire. Les molécules liposolubles et les petites molécules hydrosolubles traversent la barrière épithéliale par voie transcellulaire, alors que les molécules de moyenne et de grande taille passent par la voie paracellulaire en impliquant les jonctions serrées et l'espace paracellulaire. Les deux voies sont en équilibre permanent. Le passage paracellulaire joue également un rôle important dans le maintien du transport épithélial continu, prévenant ainsi l'apparition d'un gradient électrochimique susceptible de contrôler le transport transcellulaire. De plus le passage paracellulaire peut prendre le relais de la voie transcellulaire et assurer l'absorption lorsque les transporteurs cellulaires sont saturés (Kapus et Szaszi, 2006).

### **2.2.1 Voie transcellulaire**

Elle s'effectue par diffusion passive via les aquaporines (molécules hydrophiles de petite taille), par transport actif impliquant les transporteurs (acides aminés, vitamines, etc.) ou par endocytose, transcytose ou exocytose (peptides de grande taille et protéines). Le transport transcellulaire assure également le passage des molécules de grande taille incapables de passer à travers l'espace paracellulaire (Keita et Soderholm, 2010).

### **2.2.2 Perméabilité paracellulaire**

La perméabilité paracellulaire assure le passage des électrolytes et de l'eau, mais aussi le transport sélectif des molécules de grande taille. Dans les conditions physiologiques, la voie paracellulaire est considérée peu perméable aux grosses molécules. Le passage des molécules via la voie paracellulaire est sous le contrôle des jonctions intercellulaires, essentiellement les jonctions serrées. La perméabilité paracellulaire peut être déterminée par la mesure de résistance transépithéliale ou par évaluation du passage de molécules marquées du pôle muqueux au pôle séreux.

### 2.2.2.1 La mesure de la résistance transépithéliale (TER)

La TER est un paramètre indicateur de l'intégrité de l'épithélium et du degré d'organisation des jonctions serrées entre cellules. La TER résulte de la résistance de la voie transcellulaire corrélée aux résistances de la voie paracellulaire. La résistance transcellulaire est représentée par des résistances en séries de la membrane apicale et basolatérale. La résistance paracellulaire est constituée de la résistance au niveau du complexe apical (jonctions serrées), et la résistance de l'espace paracellulaire. La résistance de l'espace paracellulaire étant très faible et souvent négligée, et les résistances au niveau des membranes sont très élevées. Donc, c'est la variation des résistances au sein des jonctions serrées qui détermine si l'épithélium est lâche ou non. La résistance transépithéliale est mesurée à l'aide de deux électrodes. Pour cela différents appareils peuvent être utilisés. Nous utiliserons un Ohm-mètre (ENDOHM-12, World Precision Instruments, USA) pour mesurer la TER. Les valeurs expérimentales de TER sont souvent exprimées en  $\Omega\text{cm}^2$ . Le désavantage de cette technique est qu'elle fournit les informations seulement concernant le passage des particules chargées et ne peut être utilisée pour des mesures *in vivo*.

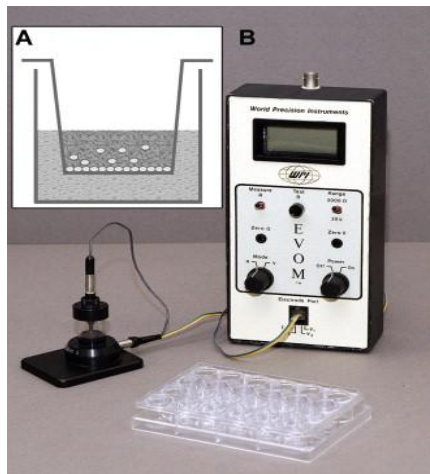


Figure 9: EndOhm-12. A) L'insert qui doit être placé dans la cupule de l'appareil EndOhm pour mesurer la TER. B) L'appareil EndOhm-12 proprement dit.



#### **2.2.2.2 Le passage des molécules marquées**

Cette méthode d'évaluation de l'intégrité des jonctions serrées consiste à suivre la perméabilité des macromolécules, comme le mannitol, l'inuline, le dextran (4 kDa) marquées par des fluorochromes ou isotopes radioactifs ( $^{51}\text{Cr}$ ). On peut alors mesurer la fluorescence présente dans le compartiment apical ou basolatéral pour savoir s'il a eu des échanges entre 2 compartiments.

### **2.3 Les jonctions serrées**

#### **2.3.1 Généralités**

Les jonctions serrées des cellules épithéliales sont les plus importantes des composantes du complexe jonctionnel. Elles sont situées au pôle apical des cellules épithéliales et elles forment une barrière contre la diffusion paracellulaire (Aijaz et al., 2007). Elles forment un anneau ceinturant le pourtour de la cellule permettant une occlusion complète de l'espace intercellulaire d'où leur appellation : *Zonula Occludens* (ZO).

La barrière formée est sélective et régule le passage des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire (barrier function). Elle empêche également les protéines et les lipides de la membrane apicale de diffuser vers la membrane basolatérale, et inversement (fence function) (Tsukita et Furuse, 1999), et contribue finalement au maintien de la polarité cellulaire. La formation de ces jonctions se caractérise par une complexité structurale macromoléculaire composées de protéines transmembranaires (claudines, occludines et Junctional Adhesion Molecules), de protéines cytoplasmiques (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) et du cytosquelette (filaments d'actine). Toutes ces protéines sont essentielles au maintien de l'adhérence cellule-cellule et au contrôle de la prolifération et de la polarité cellulaires.

#### **2.3.2 Structures des jonctions serrées**

Les jonctions serrées se présentent en microscopie électronique, comme une série de fusion apparente des feuillettes externes des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes.

Les zones de contact apparaissent, par cryofracture, sous forme d'un réseau continu de fibres ramifiées et anastomosées qui entoure l'apex de chaque cellule (Zahraoui, 2004). Ces fibres sont principalement constituées par des protéines transmembranaires (claudines, occludines et Junctional Adhesion Molecules), mais aussi les protéines cytoplasmiques (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) et du cytosquelette (filaments d'actine).

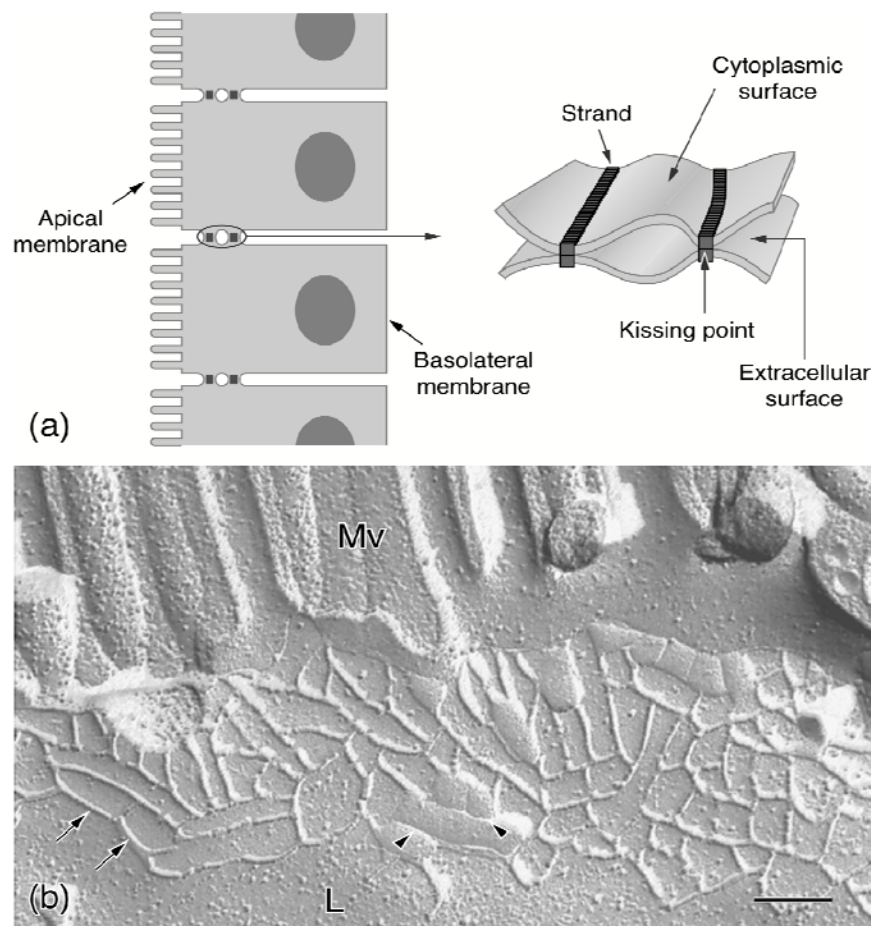


Figure 10: Structure des jonctions serrées. (a) Représentation schématisée des jonctions serrées. Les jonctions serrées (encerclées) sont localisées à la partie la plus apicale des membranes latérales. Les jonctions serrées constituent un réseau élaboré des brins pairés

qui forment les ‘kissing points’ qui éliminent l’espace extracellulaire. Les brins des jonctions serrées agissent également comme une barrière entre les domaines apicaux et basolatéraux membranaires. (b) Image de la cryo-facture de cellules épithéliales intestinales de rat fixées à la glutaraldéhyde. Les jonctions serrées paraissent comme un réseau de brins anastomosés continu dans la face-P (flèches), avec des sillons complémentaires dans la face-E (têtes de flèche) entre la microvillosité (Mv) apicale et la membrane latérale. Barre, 0,2 micromètre.

### **2.3.3 Organisation moléculaire des jonctions serrées**

Sur le plan moléculaire, deux constituants majeurs, les claudines et l’occludine copolymérisent pour former les brins des jonctions serrées. Les JAM (Junctional Adhesion Molecules) ont été localisées aux jonctions serrées sans que l’on soit sûr qu’elles sont directement impliquées (Tsukita et Furuse, 1999).

Les jonctions serrées comprennent 3 types de protéines transmembranaires qui constituent le noyau de l’échafaudage moléculaire: l’occludine, les claudines, les JAM. On distingue aussi un grand nombre des protéines cytoplasmiques périphériques. Alors que les protéines transmembranaires assurent l’adhésion cellule-cellule, les protéines de la plaque cytoplasmique lient les protéines transmembranaires au cytosquelette. Ces adaptateurs recrutent ensuite les protéines régulatrices telles que les kinases phosphatases, GTPases, et les facteurs de transcription aux jonctions serrées (Köhler et Zahraoui, 2005).

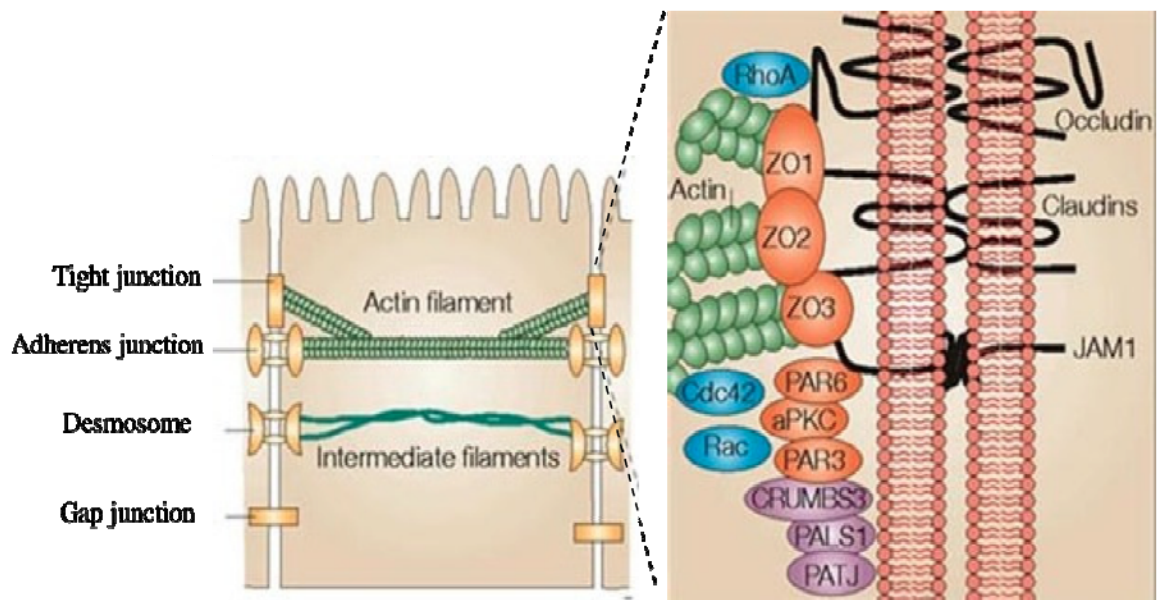


Figure 11: Organisation des complexes protéiques au sein des jonctions serrées (Aktories et Barbieri, 2005).

### 2.3.3.1 Les protéines transmembranaires

#### 2.3.3.1.1 L'occludine

L'occludine est la première protéine intégrale de 60 kDa identifiée dans les jonctions serrées chez les poussins (Ando-Akatsuka et al., 1996). L'occludine est formée par 4 domaines transmembranaires, un long domaine cytoplasmique carboxy-terminal et un très court domaine amino-terminal également cytoplasmique (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Les anticorps monoclonaux et polyclonaux produits contre l'occludine des souris reconnaissent les occludines des souris, des chiens, humains et porcins concentrées exclusivement au niveau des jonctions serrées.

La localisation de l'occludine aux jonctions serrées est régulée par la phosphorylation. Il n'y a pas d'occludine non phosphorylée dans la membrane basolatérale contrairement à l'occludine phosphorylée localisée au niveau des jonctions (Sakakibara et

al., 1997). La microscopie à immunofluorescence met en évidence l'intensité de coloration proportionnelle au nombre des jonctions serrées (Saitou et al., 1997). Son rôle n'est pas clairement connu, certaines études sur les cellules épithéliales en culture ont indiqué l'utilité de l'occludine dans la fonction de barrière des jonctions serrées.

Les souris ayant subi une mutation au niveau du gène codant pour l'occludine sont viables et développent des jonctions serrées non affectées morphologiquement ainsi qu'une fonction barrière intestinale normale. Les anomalies histologiques telles que l'inflammation chronique, l'hyperplasie de l'épithélium gastrique, l'atrophie des testicules sont observées, ce qui suggère le fonctionnement beaucoup plus complexe de l'occludine (Saitou et al., 2000).

L'occludine se lie à plusieurs protéines "signal" s'occupant ainsi du recrutement et de la coordination des voies cellulaires des jonctions serrées. Par exemple, sa liaison aux récepteurs TGF- $\beta$  (transforming growth factor-  $\beta$ ) de type I localisés au niveau des jonctions serrées entraîne leur désorganisation avec une transition de la cellule épithéliale en cellule mésenchymateuse (Barrios-Rodiles et al., 2005).

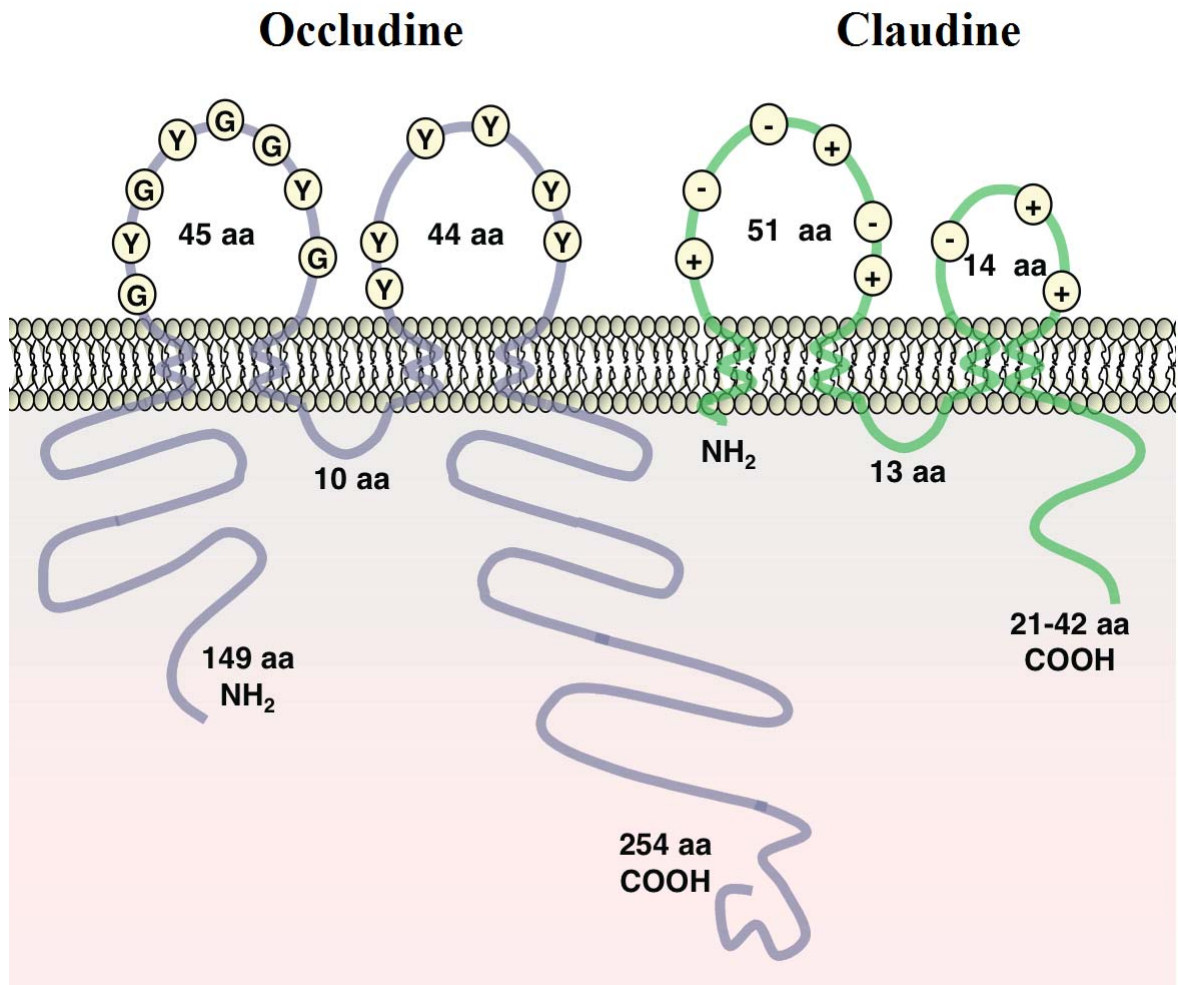


Figure 12: Représentation schématique de l'occludine et de la claudine. Adapté de Gonzalez-Mariscal et al., 2003. Les boucles extracellulaires de l'occludine sont approximativement de la même taille: elles ne possèdent pas de résidus chargés et sont très riches en tyrosine (Y). Plus de la moitié des résidus de la première boucle sont des tyrosines et glycines (G). Quant aux claudines, la première boucle extracellulaire est plus longue que la deuxième. Les deux boucles des claudines démontrent des résidus chargés qui pourraient influencer le passage des ions à travers l'espace paracellulaire.

### **2.3.3.1.2 Les claudines**

En 1998, deux nouvelles protéines membranaires intégrales (~23 kD) sont identifiées et nommées claudine-1 et claudine-2 (Tsukita et Furuse, 2000). À jour 24 membres de cette famille sont identifiés. La plupart de ces protéines ont la capacité d'induire la formation des jonctions serrées quand elles sont introduites dans les cellules fibroblastiques de souris (Tsukita et Furuse, 1999).

Les claudines présentent quatre domaines transmembranaires, mais ne possèdent aucune séquence commune avec l'occludine (Furuse et al., 1998). Elles sont aussi exclusivement localisées au niveau des jonctions serrées (Morita et al., 1999a). Le type de claudine exprimé dépend du type cellulaire, à titre d'exemple la claudine-5 s'exprime au niveau des cellules endothéliales (Morita et al., 1999b) alors que la claudine 11 s'exprime dans les cellules Sertoli et les oligodendrocytes (Morita et al., 1999c;).

Les claudines comme l'occludine interagissent par leurs domaines extracellulaires avec les molécules de la cellule voisine pour établir le contact cellule-cellule. Les claudines forment des pores permettant une diffusion sélective des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire (Tsukita et Furuse, 2000). La perméabilité sélective de ces canaux est fonction de la concentration et du type de claudine exprimé par la cellule épithéliale ou endothéliale : par exemple, la claudine-16 est responsable de canaux magnésium dans la branche large ascendante de l'anse de Henle contrairement à la claudine-4 qui forme les canaux sodiques.

### **2.3.3.1.3 Les JAMs**

Les JAMs possèdent deux domaines extracellulaires ressemblant aux immunoglobulines, un seul domaine transmembranaire, et une courte queue cytoplasmique (Palmeri et al., 2000). Elles s'associent latéralement à la claudine d'où son implication dans l'adhésion cellule-cellule.

Contrairement aux claudines et à l'occludine, les JAM sont exprimés dans les plaquettes et leucocytes et régulent l'activation et l'adhésion des plaquettes, la migration des leucocytes, l'angiogenèse, la forme des cellules épithéliales (Kang et al., 2007).

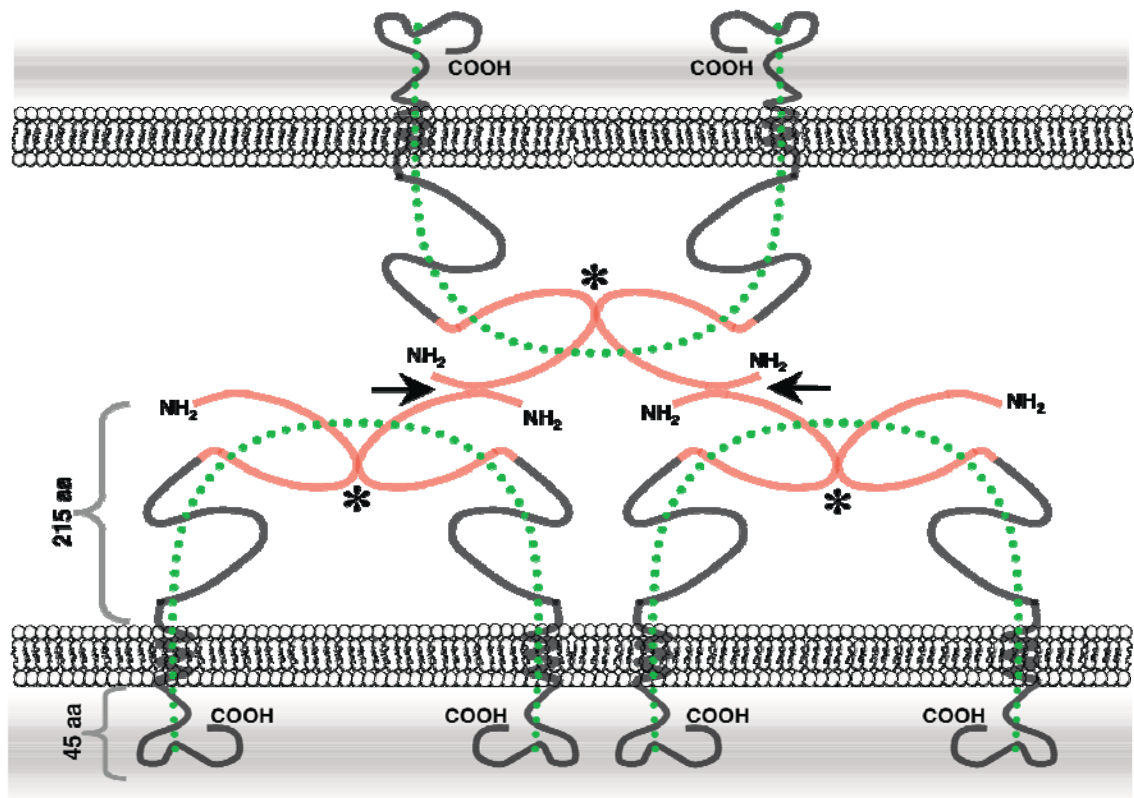


Figure 13: Interaction homophile des molécules JAM. Les dimères JAM en forme U (représenté par une ligne verte discontinue) sont presque perpendiculaires à la surface cellulaire tandis que leurs premières boucles amino-terminales (rouge) sont presque parallèles à la surface cellulaire et entrent en contact dans un plan commun (astérisques). Les interactions paracellulaires de JAM ont lieu entre les premières boucles des molécules JAM situées sur des membranes cellulaires apposées l'une sur l'autre (flèches). Les réseaux JAM sont donc construits par la répétition du motif structural des dimères en forme de U sur des cellules avoisinantes (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).



#### 2.3.3.1.4 Les Crumb (Crb)

Ce sont des protéines présentant un domaine transmembranaire unique, exprimées dans les neurones, les cellules épithéliales et les cellules photoréceptrices. Trois Crb ont été mises en évidence chez l'homme, dont la protéine Crb3 est associée aux jonctions serrées et à la membrane apicale intestinale (Makarova et al., 2003 ).

#### 2.3.3.2 Les protéines cytoplasmiques

Les protéines membranaires constituent le noyau de l'échafaudage moléculaire relié à une multitude de protéines cytoplasmiques. La première protéine cytoplasmique identifiée est la protéine ZO-1(*Zonula Occludens-1*), une protéine de 210-225 kDa (Stevenson et al., 1986). Les protéines ZO-2 et ZO-3 sont associées aussi aux jonctions serrées. Ces protéines ZO possèdent des séquences communes : trois domaines PDZ (PDS 95 : Post Synaptic Density 95, Dig : Disc large et ZO), ainsi que les domaines SH-3 (Sequency Homology-3) et GK (Guanylate Kinase). Les ZO sont associées au terminal carboxyl des claudines par le premier domaine de PDZ (Itoh et al., 1999a). Il a été constaté que les ZO-1 contenant les domaines 2 et 3 de PDZ se lient à JAM (Ebnet et al., 2000) et ZO-1 se lie à l'occludine par son domaine GK (Fanning et al., 1998).

Le domaine PDZ se lie à des séquences de quatre acides aminés se terminant par une valine. Toutes les claudines sauf la claudine-12 peuvent donc se lier au domaine PDZ présent sur les protéines ZO, car elles possèdent au niveau de leur extrémité carboxy-terminale une valine à la fin. En plus des protéines ZO, on trouve d'autres protéines cytoplasmiques à domaines PDZ telles que MUPP1( multi-PDZ domain protein1), Par-3/ASIP(partitioning defective/ atypical PKC isotype-specific interacting protein), Par-6, Pals (protein associated with lin-7), et MAGI-1à 3 (membrane associated guanylate kinase with inverted domain structure) (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

Les ZO sont recrutées au niveau des jonctions serrées chez les souris déficientes pour le gène codant pour l'occludine (Itoh et al., 1999a).

Ceci laisse supposer que l'occludine n'est pas nécessaire pour leur localisation péri-jonctionnelle. PATJ (protein associated with tight junctions) a été localisée aussi dans les jonctions serrées et sa surexpression affecte l'accumulation de la protéine ZO-3 dans cette structure (Lemmers et al., 2004).

Les JAM, nombreuses en périphérie des plages jonctionnelles peuvent aussi se lier aux protéines ZO, ainsi que d'autres molécules à domaines PDZ. Les filaments d'actine se lient à la portion carboxy-terminale de ZO-1 et de ZO-2 (Itoh et al., 1997). Ces dernières sont des adaptateurs moléculaires permettant la liaison de diverses protéines membranaires au cytosquelette d'actine.

Ce complexe permet de relier le cytosquelette aux jonctions serrées. Cette interaction a un rôle primordial dans la régulation des jonctions serrées. Il existe d'autres protéines cytoplasmiques impliquées dans la formation des jonctions serrées, parmi lesquelles on peut citer : Rab13, Cdc 42 (cell division control protein 42), cinguline, symplekine, PKCa (PKC atypique), ZONAB (ZO-I associated nucleic acid protein), huASH1 (Absent Small or Homeotic discs1) ou SAF-B (Scaffold Attachment Factor-B).

## **2.4 La formation des jonctions serrées**

Au départ, l'établissement de contacts cellule-cellule se fait par le biais des protéines de surface (E-cadhérine) dépendante du calcium et ensuite un complexe jonctionnel composé de protéines des jonctions adhérentes et serrées se met en place (Gumbiner et Simons, 1986). Les protéines membranaires intégrales, notamment les claudines sont impliquées dans les interactions homophiles ou hétérophiles d'adhérences. Les claudines ont quatre domaines transmembranaires hydrophobes et deux boucles extracellulaires, la première étant plus grande que la seconde. Les boucles extracellulaires, dont les séquences sont distinctes dans les claudines différentes contribuent à la formation des brins des jonctions serrées.

Ces boucles interviennent de même pour la formation des canaux ioniques sélectifs. En général les brins des jonctions serrées sont des co-polymères linéaires des claudines, de l'occludine et diverses protéines à domaine PDZ tel que les JAM. Notons que les interactions additionnelles entre les protéines cytoplasmiques périphériques à domaine PDZ jouent également un rôle important dans le maintien de l'intégrité jonctionnelle (Ulhas et Meghna, 2008).

Les protéines régulatrices comme Cdc42 ou Rab13 activées induisent la stabilité des contacts intercellulaires et l'activation de PKCa, qui joue un rôle déterminant dans la régulation de l'assemblage des jonctions serrées. Le PKCa forme un complexe avec Par-3 et Par-6 (Partitioning Defective) (Izumi et al., 1998). Les gènes Par identifiés premièrement chez le nématode *Caenorhabditis elegans* régulent la localisation asymétrique de plusieurs protéines, l'orientation du fuseau mitotique et la division cellulaire asymétrique (Joberty et al., 2000). Par-6 possède un domaine PDZ et un motif CRIB (Cdc42/rac interactive binding) interagissant avec Cdc42 ce qui permet de découvrir le domaine N-terminal de Par-6 ayant la capacité d'activer le PKCa. Il y aura ensuite une phosphorylation de Par-3 qui activera la maturation des jonctions serrées fonctionnelles (Lemmers et al., 2004).

Le complexe Par-6/ Par-3/PKCa est à son tour recruté au niveau des jonctions serrées grâce aux JAM qui servent de points d'attache à Par-3 (Ebnet et al., 2000), ce complexe étant nécessaire pour la formation de deux jonctions serrées et la polarité des cellules épithéliales (Suzuki et al., 2001). La protéine phosphatase 2A (PP2A) déphosphorlye la protéine PKCa, ainsi que les protéines des jonctions serrées : ZO-1, occludine et les claudine-1 d'où l'inhibition de l'assemblage des jonctions serrées. La désactivation de PP2A par l'acide okadaïque stimule la phosphorylation et le recrutement des protéines ZO-1, occludine, et claudine-1 aux jonctions serrées (Nunbhakdi-Craig et al., 2002).

La famille des protéines Rho (Rho, Rac et Cdc42) est impliquée dans la formation des jonctions serrées, interactions cellulaires et dans la régulation de la perméabilité paracellulaire sélective.

L'inactivation des protéines Rho entraîne la dégradation des filaments d'actine et la redistribution de ZO-1 et de l'occludine. C'est l'une des causes de l'augmentation du flux paracellulaire et une diminution de la résistance transépithéliale (Berkes et al., 2003). Les protéines Rho régulent l'organisation du réseau d'actino-myosine requis pour l'immobilisation des complexes macromoléculaires au niveau des jonctions serrées, pouvant influencer ainsi l'organisation et la perméabilité de ces dernières (Nusrat et al., 1995).

## **2.5 Régulations fonctionnelles des jonctions serrées par les facteurs extracellulaires.**

Les jonctions serrées de la barrière épithéliale intestinale sont sous le contrôle continu de différents facteurs endogènes ou exogènes comme la microflore, l'alimentation, les enzymes digestives et protéolytiques sécrétées dans la lumière intestinale. *V.cholerae* sécrète une métalloprotéase à zinc « Haemagglutinin Protease, (HA/P) » capable d'altérer la distribution des filaments d'actine et de ZO-1, dégradant ainsi l'occludine alors que ZO-1 reste intacte (Berkes et al., 2003).

La phosphorylation de la chaîne légère de myosine sous l'action de MLCK (Myosin Light Chain Kinase) a été observée après une infection des cellules épithéliales par les EPEC, accompagnée d'altérations de la barrière épithéliale (Yuhan et al., 1997). Ainsi, la réorganisation du cytosquelette au niveau apical et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire intestinale via l'ouverture des jonctions serrées apparaissent de manière constitutive avec la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (Goeckeler et Wysolmerski, 1995). La régulation de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine qui entraîne la contraction de l'anneau périjonctionnel d'actino-myosine semble être un mécanisme important dans la régulation de l'ouverture des jonctions serrées. Lorsque l'anneau périjonctionnel d'actino-myosine est relâché, la tension sur les jonctions serrées est réduite, ce qui provoque leur fermeture et une diminution de la perméabilité.

La phosphorylation de l'occludine permet son assemblage avec la membrane cellulaire formant une barrière à la perméabilité. Cependant le traitement d'une monocouche des cellules Caco2 par le TNF- $\alpha$  ( Tumor Necrosis Factor alpha) conduit à une réduction de la résistance transépithéliale et une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale suite à la destruction des jonctions serrées (Cui et al., 2010).

Ainsi la cytochalasine D en détruisant les filaments d'actine provoque une désorganisation des microfilaments et la contraction de l'anneau périjonctionnel d'actino-myosine survient, par conséquent, la perméabilité des jonctions serrées augmente (Turner, 2000).

Le promoteur fort des tumeurs TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) active les protéines kinases cellulaires et détruit les polymères d'actines (F-actine) au niveau des jonctions. Les conséquences sont une baisse de la résistance transépithéliale ainsi que l'augmentation de la perméabilité des jonctions serrées (Conn et Knudsen, 1989).

L'entrée de  $\text{Na}^+$  et de glucose ou acides aminés peut modifier la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , puis l'état de phosphorylation des éléments du cytosquelette et conduire à une contraction permettant l'ouverture transitoire des jonctions serrées.

## 2.6 Toxines affectant les jonctions serrées

Les différents pathogènes entériques affectent les jonctions serrées via le cytosquelette ou directement les protéines des jonctions serrées. L'impact sur les jonctions serrées résulte de la dégradation par les toxines, les protéases ou des altérations biochimiques telles que la phosphorylation ou déphosphorylation (Berkes et al., 2003).

### 2.6.1 Toxine de *Bacteroides fragilis* (BFT)

*Bacteroides fragilis* est l'une des bactéries qui détruisent les jonctions serrées par une dégradation protéolytique. Les souches diarrhéiques de *B. fragilis* produisent une toxine extracellulaire de 20 kDa, BFT « *Bacteriodes fragilis* toxin » appelée aussi fragilysine (Myers et al., 1987).

C'est une métalloprotéase avec un motif de liaison au zinc capable d'hydrolyser beaucoup de protéines : la gélatine, le fibrinogène et les filaments d'actine (Moncrief et al., 1995). La BFT clive le domaine extracellulaire de la E-cadherine chez les cellules HT-29, une glycoprotéine transmembranaire responsable de l'adhérence entre les cellules épithéliales (Wu et al., 1998). Les cellules deviennent rondes et perdent leurs microvillosités (Koshy et al., 1996). En théorie, la protéolyse du domaine intracellulaire de l'E-cadhérine affecterait l'association E-cadhérine avec la  $\beta$ -catenine, qui lie E-cadhérine à l' $\alpha$ -catenine, entraînant ainsi une destruction des filaments d'actine. Il a été prouvé que cette toxine diminue la TER et augmente la perméabilité paracellulaire quand elle est mise en contact avec une monocouche de cellules T-84 (Obiso et al., 1997).

### **2.6.2 L'Entérotoxine de *Clostridium perfringens* (CPE)**

*C.perfringens* est une bactérie anaérobie qui cause des gastroentérites, pouvant entraîner aussi des diarrhées associées aux antibiotiques (Carman, 1997; Abrahao et al., 2001). L'infection est causée par les souches qui produisent la CPE (Sparks et al., 2001). Cette toxine possède un domaine de liaison carboxy-terminal alors qu'une partie active est localisée à l'extrémité amino-terminale (Hanna et al., 1991; Hanna et al., 1992). Après la liaison de CPE à la surface cellulaire, elle reste liée à la membrane plasmique et augmente la perméabilité (McClane, 1994), suite aux dommages tissulaires qui en résultent (Sherman et al., 1994). Les interactions de CPE avec la membrane aboutissent à la formation d'une série de complexes de 90,135, 155 et 200 kDa en taille, capables de former des pores dans la membrane plasmique apicale (Wieckowski et al., 1994). La CPE peut induire la destruction des jonctions serrées et déplacer la claudine-4 des jonctions serrées si appliquée à la surface basolatérale des cellules hépatiques des rats (Rahner et al., 1999). Ces changements morphologiques se traduisent par une diminution de la TER et une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Une protéine de 20 kDa dans les cellules Vero agit comme récepteur de CPE (CPE-R) (Katahira et al., 1997).

Deux protéines homologues dans les cellules intestinales humaines (hCPE-R et RVP-1) de la famille des claudines, nommées : claudine-3 et claudine-4 (Katahira et al., 1997) sont reconnues récepteurs de CPE. Il est intéressant de noter que d'autres protéines des jonctions serrées peuvent servir de récepteurs aux virus. Par exemple, une protéine transmembranaire des jonctions (JAM) sert de récepteur au Réovirus (Barton et al., 2001). En plus, les récepteurs des coxsackievirus et adénovirus sont des protéines transmembranaires des jonctions serrées (Cohen et al., 2001).

### **2.6.3 Les toxines A et B de *Clostridium difficile***

Les toxines A et B de *Clostridium difficile* monoglycosylent les protéines Rho (Rho, Rac, and Cdc42) en utilisant l'UDP-glucose comme co-substrat (Just et al., 1995). Ceci a pour effet d'inactiver les protéines Rho GTPases donnant lieu à une dégradation des filaments d'actine et le niveau d'actine soluble augmente, les cellules devenant rondes. La perte de l'organisation de l'anneau périjonctionnel des filaments d'actine permet une diminution de TER et une augmentation du flux paracellulaire, ce qui indique la destruction des jonctions serrées (Nusrat et al., 2001). Les toxine A et B peuvent causer également la redistribution des protéines des jonctions serrées telles que ZO-1 et l'occludine dans le cytoplasme cellulaire (Nusrat et al., 2001), grâce à l'activation des protéines kinase C (PKC $\alpha$  et PKC $\beta$ ) (Chen et al., 2002).

### **2.6.4 La toxine ZOT (Zonula Occludens Toxin)**

La toxine ZOT (*Zonula Occludens Toxin*) est une entérotoxine de 399 acides aminés sécrétée par *V.cholerae* (Schmidt et al., 2007). Cette toxine augmente la perméabilité intestinale par atteinte des jonctions serrées inter-entérocytaires. En effet, ZOT se fixe sur son récepteur et s'internalise. À l'intérieur de la cellule, ZOT active les phospholipases C, qui à leur tour hydrolysent le phosphatidyl inositol libérant l'inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP3) et le DiAcylGlycerol (DAG). PKC $\alpha$  est activé soit directement par DAG ou par le calcium intracellulaire libéré via IP3. Ensuite, PKC $\alpha$  catalyse la phosphorylation des protéines cibles. L'actine globulaire est polymérisé sous forme filamenteuse.

La polymérisation excessive entraîne le réarrangement des filaments d'actine et le déplacement des protéines (ZO-1) du complexe jonctionnel. L'intégrité des jonctions serrées est ainsi perdue (Fasano, 2002).

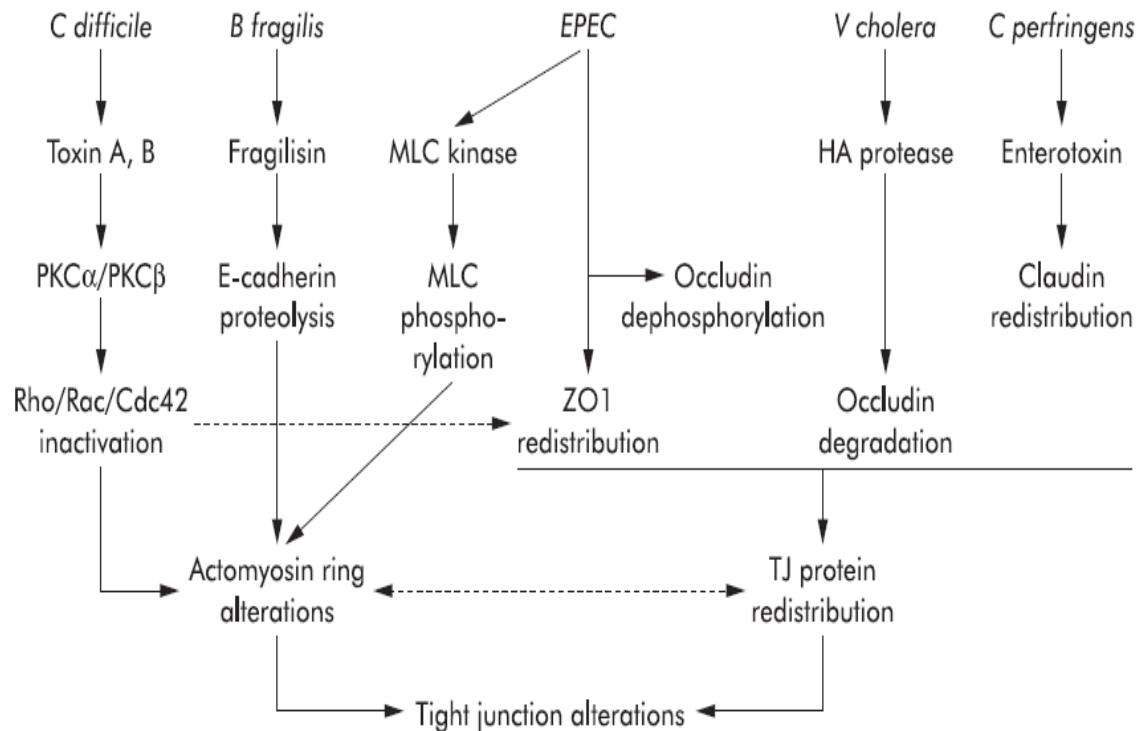


Figure 14: Les jonctions serrées peuvent être altérées par divers pathogènes ainsi que par leurs toxines. Ces effets peuvent résulter d'une modification directe des protéines des jonctions serrées dont l'occludine, les claudines et ZO-1, ou par l'altération de l'anneau actino-myosine périjonctionnel. Les étapes de signalisation intermédiaire de ce processus n'ont pas été complètement caractérisées. La relation exacte entre la perturbation des protéines des jonctions serrées et la perturbation de l'anneau actino-myosine n'est pas claire présentement. (PKC $\alpha$ , protéine kinase Ca; PKC $\beta$ , protéine kinase C $\beta$ ; EPEC, *E.coli* entéropathogénique; MLC, chaîne légère de myosine; HA, hemagglutinine.). Tiré de Berkes et al., 2003.



### 3. Objectifs et approches expérimentales.

Comme je l'ai mentionné, le mécanisme d'action de la toxine STb consiste en une oligomérisation de la toxine (Labrie et al., 2001b) et l'attachement à son récepteur (Rousset et al., 1998). Par la suite, la toxine STb perméabilise la membrane par la formation de pores non spécifiques (Goncalves et al., 2007) et elle est ainsi internalisée (Chao et Dreyfus, 1997).

Le modèle proposé du mécanisme d'action de STb (Dubreuil, 2006a ; Dubreuil, 2008) est le suivant : une fois dans le cytoplasme ou ancrée dans la membrane, la protéine Gai3 couplée à un canal calcique est activée et l'augmentation des ions calcium intracellulaire entraîne à son tour l'activation d'une protéine kinase II calcium-calmoduline dépendante. Ainsi, la protéine kinase C et le CFTR sont activés. L'augmentation de calcium contrôle la régulation des phospholipases A2 et C qui libèrent l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. Le PGE2 et 5-HT sont alors formés entraînant l'ouverture de divers canaux ioniques membranaires, et les ions sécrétés  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  causent une perte d'eau par osmose menant aux diarrhées observées.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a été effectuée pour démontrer si la toxine STb affecte les jonctions serrées ce qui permettrait le passage des ions de l'espace paracellulaire vers la lumière intestinale. La toxine STb d'*Escherichia coli* est responsable de diarrhées chez les animaux et probablement chez l'homme. Les jonctions serrées forment une barrière et régulent le passage des électrolytes et de l'eau dans l'espace paracellulaire. Compte tenu de l'homologie de séquence entre STb et ZOT ( tableau 1) et les effets de cette dernière sur les jonctions serrées, on s'est posé la question à savoir si les jonctions serrées ne seraient pas impliquées dans l'apparition des diarrhées causées par STb.

Notre hypothèse est que les jonctions serrées sont affectées par la toxine STb et qu'une perte de l'intégrité de ces structures pourrait expliquer, du moins en partie, la fuite de l'eau et des électrolytes provoquant ainsi une diarrhée où par définition la teneur en eau des fèces dépasse 85%.

Pour répondre à notre question et vérifier notre hypothèse, quelques objectifs ont été fixés: 1) étudier l'effet de souches STb-positives et de la toxine STb purifiée sur les jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales humaines T84 et 2) déterminer la(les) protéine(s) des jonctions serrées affectée(s) par la toxine STb.

Ainsi pour atteindre ces objectifs, les cellules épithéliales intestinales humaines (T84), étaient cultivées dans des transwells, puis elles étaient mises en contact avec les souches d'*E.coli* STb-positives, STb purifiée ainsi que le peptide STb24-31. Les témoins négatifs consistaient en cellules traitées par une souche *E.coli* commensale (virotypage : négative), des cellules non traitées mais également la toxine STb mutée (D30V) et un peptide aléatoire ont été utilisés. La résistance transépithéliale était mesurée avec un appareil "EndOhm-12, après incubation de 24h, et la perméabilité paracellulaire était mesurée après la même période d'incubation en suivant le flux de BSA-FITC du compartiment apical vers le compartiment basolatéral. Le marquage des protéines des jonctions serrées nous a permis de discerner les effets de STb sur ces protéines en microscopie confocale. Les résultats obtenus au cours de notre travail sont présentés dans la section suivante.

## **MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS**

**ARTICLE****Escherichia coli STb Enterotoxin Impairs Intestinal Epithelial Barrier Function by Altering Tight Junction Proteins**

(in preparation)

*Escherichia coli* STb Enterotoxin Impairs Intestinal Epithelial Barrier Function by Altering  
Tight Junction Proteins

C. Ngendahayo Mukiza and J.D. Dubreuil\*

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc  
Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, Québec, Canada

\*Corresponding author

Mailing address : Département de pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine  
Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada,  
J2S 7C6

Phone: +1(450)773-8521 ext.8433, Fax: 450 778-8108

## ABSTRACT

*Escherichia coli* heat-stable toxin (STb) causes diarrhea in man and animals. STb binds to sulfatide, its receptor, followed by its internalization. Inside the cytoplasm, through a cascade of events, STb triggers the opening of ion channels allowing ion secretion and water loss leading to diarrhea. Tight junctions (TJs) are well known for controlling paracellular traffic of ions and water by forming a physical intercellular barrier in epithelial cells. Some bacterial toxins are known to affect adversely TJs. To date, the impact of STb on TJs has not been investigated. The present study aimed to explore the effect of STb on TJs and the barrier function in intestinal epithelial cells. Human colon intestinal epithelial cells (T84) were treated for 24h with either purified STb toxin or an *E. coli* strain expressing STb. TransEpithelial Resistance (TER), paracellular flux marker and confocal microscopy were used to analyze the effect of STb toxin on TJs. An *E. coli* strain expressing STb as well as purified STb caused a significant reduction of TER ( $p < 0.0001$ ) parallelly to an increase in paracellular permeability to BSA-FITC ( $p < 0.0001$ ) compared to untreated cells or a commensal non toxinogenic *E. coli* strain. The increased paracellular permeability induced by STb was associated with a marked general dissolution and condensation of central F-actin stress fibers. F-actin disorganisation was accompanied by redistribution and fragmentation of occludin, claudin-1 and ZO-1 (Zonula Occludens-1) proteins. These changes were also observed following intoxication of T84 cells with an 8 amino acids peptide found in the STb sequence corresponding to a consensus sequence of *Vibrio cholerae* Zot toxin, shown to be involved in TJs disassembly. This effect was not observed with the scramble peptide or D30V mutant. Our findings suggest that STb induces epithelial barrier dysfunction by changes in tight junction proteins that could contribute to the observed diarrhea. These results provide new insight into the diarrhea pathogenesis caused by STb.

**Keywords:** Tight junctions, actin cytoskeleton, transepithelial resistance, diarrhea, paracellular permeability, *Escherichia coli*, secretion, STb toxin.

## INTRODUCTION

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are a major common cause of severe diarrhea in some newborn animals (Nagy and Fekete, 2005) and human diarrhea in young children in developing countries, as well as travelers worldwide. ETEC express virulence factors including fimbrial adhesins that mediate the attachment of bacteria to the intestinal epithelial cells and enterotoxins that disrupt intestinal fluid homeostasis causing diarrhea (Nagy and Fekete, 1999), (Vu-Khac et al., 2007). In addition to adhesive and enterotoxic virulence factors, pathogenesis involves host factors which are mostly the receptors for adhesins and enterotoxins. The characteristics and mechanisms of action of many adhesive and enterotoxic virulence factors are well known, but others are partially understood or completely unknown.

STb, a 48-amino acid peptide of 5.2 kDa is one of the thermostable enterotoxins secreted by ETEC responsible for intestinal fluid secretion resulting in diarrhea in many animals and man (Beausoleil et al., 2002b). STb acts by binding to cells through its receptor, sulfatide (Rousset et al., 1998). Then, STb is internalized and activates a pertussis toxin-sensitive G protein (G $\alpha$ i3), resulting in calcium ions entry through a ligand-gated calcium ion channel (Dreyfus et al., 1993), (Harville and Dreyfus, 1995), (Harville and Dreyfus, 1996). The elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration stimulates arachidonic acid release from membrane phospholipids, through phospholipase C activity and a subsequent production of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) which mediate transport of water and electrolytes such as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> into the intestinal lumen resulting in watery diarrhea (Peterson and Whipp, 1995). Goncalves et al (2007) demonstrated that STb induces nonspecific pore formation in pig jejunal brush border vesicles. These pores could be involved in STb- provoked colibacillosis.

The intestinal lumen contains a single layer of epithelial cells. This is an integral and essential part of the host mucosal defense system, acting as a physical barrier (Berkes et al., 2003). This physical barrier is maintained by connections between adjoining epithelial cells consisting of specialized intercellular junctions: Tight junctions (TJs) and adherens junctions (AJs). Tight junctions seal the intercellular spaces between adjacent cells and are essential for the integrity of barrier function by restricting paracellular permeability (Balkovetz and Katz, 2003).

Tight junctions are mainly composed of the occludin and claudins family of transmembrane proteins believed to associate with the apical perijunction of F-actin ring via cytoplasmic plaque proteins such as ZO-1, ZO-2, ZO-3, etc. Furthermore, the establishment and maintenance of tight junctions is crucial to both the development and normal functioning of epithelia (Anderson et al., 1993). However, some pathogenic bacteria such as enteropathogenic *E.coli*, serotype O127:H6 (EPEC) (Philpott et al., 1996), (Yuhan et al., 1997), enterohaemorrhagic *E.coli*, serotype O157:H7 (EHEC) (Philpott et al., 1998) and bacterial toxins such as *Clostridium difficile* toxins A and B (Nusrat et al., 2001), *Vibrio cholerae* Zonula Occludens Toxin (ZOT) (Schmidt et al., 2007), Secreted Autotransporter Toxin (SAT) (Guignot et al., 2007), Shiga toxin (Li et al., 1999) target and disrupt tight junctions as measured by a decrease in TER, an increase in paracellular flux, changes in the distribution of tight junction protein complexes and reorganization of F-actin, leading to disruption of homeostasis. For example, when tight junctions of epithelial cells that cover the biliary tree and gastrointestinal tract become disorganized, jaundice and diarrhea, respectively, occur (Sawada et al., 2003).

Tight junction disruption may result either from direct modification of tight junction proteins (occludin, claudins and ZO-1) and/or by alteration of the cytoskeleton. In fact, ZOT increases intestinal permeability by interacting with a mammalian cell receptor with subsequent activation of intercellular TJs signaling.



ZOT can also induce modifications of the cytoskeleton organization that leads to the opening of TJs secondary to the transmembrane phospholipase C activity and subsequent protein kinase C- $\alpha$  dependent polymerization of actin filaments strategically localized to regulate the paracellular pathway (Di Pierro et al., 2001).

Interestingly, a sequence comparison between STb and ZOT revealed an 8 amino acid shared sequence in which 5 of the 8 amino acid are identical (GXLXVXDG). This consensus sequence of *V.cholerae* ZOT toxin has been shown to be involved in TJs disassembly after binding to its receptor and the 8 amino acid consensus sequence is responsible for the binding. The aim of the present study was to examine the effects of STb on TJs structure and function in model T84 intestinal epithelial cells, a cell line used to study bacterial enterotoxins secretory processes.

## MATERIALS AND METHODS

**Culture media, antibodies and reagents.** Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Ham's F-12 Nutrient Mixture (F-12), Phosphate Buffered Saline (PBS: pH= 7.4, without calcium chloride and magnesium chloride) and Fetal Bovine Serum (FBS), rabbit polyclonal anti-occludin, rabbit polyclonal anti-claudin-1, mouse monoclonal anti-ZO-1, goat anti-mouse Alexa 568 and goat anti-rabbit Alexa 488 antibodies, and Bovine Serum Albumin fluorescein conjugates (BSA-FITC) were purchased from Invitrogen, Canada. FITC-phalloidin and STb24-31peptide (GFLGVVDG) and the scrambled peptide (LGRDGGVF) were purchased from Sigma and Biomatik (Canada), respectively.

**Bacterial strains and culture conditions.** An *E.coli* strain expressing STb, AIDA-I-negative mutant strain PD20M (Serogroup: O143, virotype: AIDA-I<sup>-</sup>, STb<sup>+</sup>) was kindly supplied by Dr. Michael Mourez (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal) while a commensal non-toxinogenic *E.coli* strain (Serotype: O?) isolated from pig was kindly provided by Dr. John M. Fairbrother (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal).

Strain PD-20M, AIDA-I-negative mutant was generated by  $\Delta aidA::aacCI$  mutation in PD20<sup>Str</sup> by allelic exchange (Edwards et al., 1998). All these strains were stocked in 10% glycerol at -80°C. Before the experiments, bacteria were cultured on Luria-Bertani (LB) agar and incubated at 37° C during 16h. Then, for every experiment, bacteria were subcultured in LB broth overnight.

**Production and purification of STb toxin.** STb enterotoxin was produced as described previously (Syed and Dubreuil, 2012). Briefly, *E.coli* HB101 strains harboring pMal-STb, a plasmid encoding wildtype STb protein fused to the maltose binding protein, was used. Ampicillin, at a final concentration of 50 µg/ml, was used as the selection agent for bacteria carrying the plasmid pMAL-STb. Bacteria were grown in Rich Medium (10 g Tryptone, 5g Yeast extract, 5g NaCl, 2g dextrose per liter, containing 50 µg/ml of ampicillin) for 18 hours in an orbital shaker set at 37°C, 180 rpm. A volume of 5ml of an overnight bacterial culture was transferred to 500 ml of fresh Rich Medium and returned to the orbital shaker until the optical density at 600 nm reached 0.5. Then, 0.3mM IPTG (isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside) was added to induce the synthesis of the fusion protein. The induction was allowed to proceed for 3 hours in the orbital shaker. Cells were harvested by centrifugation at 4,000 x g for 15 minutes at 4°C. The pellet was gently washed in a volume of 250 ml of 30 mM Tris-HCl, (pH 8) containing 20% sucrose, and 1 mM EDTA. After centrifugation at 8,000 x g for 20 minutes at 4°C, an osmotic shock of bacteria was induced using a solution of 5 mM MgSO<sub>4</sub> containing 0.4 mM PMSF and then centrifuged at 8000 x g for 20 minutes at 4°C. The supernatant containing the fusion protein (MBP-STb), was filter sterilized using a 0.22 µm tangential flow filter (VacuCap, Pall Life Sciences) and were first purified using amylose chromatography affinity column (NewEngland BioLabs) at a flow rate of 0.2 ml/min at 4°C. A solution of 10 mM maltose was used to elute the fusion protein. The eluted proteins were dialyzed against MilliQ water using a 12,000-14,000 Da membrane (Spectrum, CA, USA).

Dialyzed material was then concentrated and cleaved using factor Xa enzyme (Roche, USA) in a cleavage buffer consisting of 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8). Using an AKTA-10 purifier system (GE healthcare), the cleaved material was loaded onto a C<sub>8</sub> reverse-phase column (Perkin Elmer, Montreal, Canada) and eluted with a linear gradient of acetonitrile in water solution containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). A standard curve at 214 nm was done of various concentration of aprotinin (MW~ 6500 Da), a molecule used as a reference. STb preparations were quantified using the generated standard curve and kept at -20°C until use. Mutated STb (D30V) with less than 10% of the biological activity of wild-type STb was purified using the same method and its properties were already described (Labrie et al., 2001b)

**Intestinal cells culture and treatments.** T84 human colon intestinal epithelial cells, used as a model to study tight junction proteins, were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells (passage 5 to 18) were maintained in equal volumes of Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) and F-12, supplemented with 5% (v/v) of fetal bovine serum (Invitrogen, Canada). Cells were cultured in T-75 culture flasks (Sarstedt, Canada) and were kept at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-95% air atmosphere. For maintenance purposes, confluent T84 monolayers were passaged weekly using trypsin-EDTA treatment in phosphate-buffered saline (PBS) without calcium chloride and magnesium chloride. For Transepithelial Electrical Resistance (TER) and intestinal cell monolayer permeability assays, a total of 300,000 cells/ml were plated on collagen-coated 12 mm polycarbonate Transwell permeable support cell culture inserts (0.4 pore size, Costar) and utilized after 6-8 days, during which cells were fed daily. After this period, electrically tight monolayers were formed. For immunofluorescence experiments, T84 cells were seeded at a density of 150,000 cells/ml on 8-well chamber slides (Fisher Scientific, Canada) and used after 2 days. One hour before treatment with purified STb or STb mutant D30V, an *E.coli* strain expressing STb (PD-20M), the scrambled peptide or STb24-31 peptide corresponding to a consensus sequence of ZOT toxin, monolayers were washed using PBS then the medium was changed to medium without FBS.

Purified STb (20 µg), STb24-31 peptide (9 µg) and various *E.coli* strains were applied to the apical surfaces of T84 monolayers during 24h for TER and paracellular permeability assays. Purified STb and STb mutant D30V, the scrambled peptide and STb24-31 peptide were used for immunofluorescence. For bacterial cell infections, overnight cultures of bacteria with OD<sub>600</sub> of 1 which correspond to approximately 5x10<sup>8</sup> CFU/ml were suspended in the culture medium. A total of 40 µl (2x 10<sup>7</sup> CFU/ well) of this suspension was added to the apical surfaces of T-84 monolayers. Infection was carried out for 3h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator, at the end of which gentamicin (400µg/ml) was added to the apical surfaces. Control monolayers were incubated with FBS-free cell culture medium only. An amount of 200µg of protease inhibitors (soybean trypsin inhibitor, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) was added to both treated and control cell monolayers before treatment.

**Transepithelial Electrical Resistance (TER) measurements.** Electrical resistance is a measure of the barrier property of the epithelium to passive ion movement, where decreased resistance indicates an increase in permeability (Philpott et al., 1996). T84 cells were seeded onto collagen-coated 12 mm polycarbonate Transwell permeable support cell culture inserts (0.4 pore size, Costar). Prior to infection and 24h after intoxication or infection, TER was measured to check the integrity of the monolayers using an Endhom-12 (Millicell-RES, Millipore). Confluent monolayers were formed when resistance was 300-600 Ωcm<sup>2</sup>. The background of a free control filter was subtracted from the initial resistance values. Experiments were performed in triplicate and the data are expressed as percentage of preinfection TER and TER measurements obtained 24h postinfection.

**Intestinal cell monolayer permeability assay.** The permeability of T84 cell monolayers was determined by measuring the paracellular passage of BSA-FITC (66 kDa), from the apical to basolateral compartment of the collagen-coated 12 mm polycarbonate Transwell permeable support cell culture inserts (0.4 pore size, Costar). T84 cells were infected in triplicate as described above.

To determine the flux from the apical to basolateral side, PBS containing FITC-BSA (Sigma) at 5 mg/ml was added to the apical side of cell monolayers, which were then incubated at 37°C for 24h. After this incubation period, samples were taken from the basolateral compartment and analyzed using a fluorescence microplate reader (Biotek, Winooski, VT). The fluorescence due to FITC-BSA was determined using Gen5 program at an excitation wavelength of 485nm, and an emission wavelength of 527 nm. Values were expressed as arbitrary units (a.u).

**Confocal microscopy of actin cytoskeleton and tight junction proteins.** 24 hours after infection, the cell monolayers were washed with PBS, fixed for 15 min at room temperature in 4% paraformaldehyde in PBS. For staining of F-actin filaments, cells were washed three times with PBS, permeabilized with 0.1% triton X-100 for 10 min at room temperature and blocked with 2% BSA in PBS for 45 min before incubation with fluorescein-phalloidin for 45 min at room temperature. The cell monolayers were rewashed three times with PBS using 1/1000 DAPI dilution in the first wash in order to visualize nuclei. For TJs proteins staining, cells were fixed with 100% ethanol at -20°C for 20 min and permeabilized with 1% Triton X-100 for 10 min at room temperature. Then cells were blocked using 5% BSA/PBS for 30 min at room temperature. All cells were incubated in 1% BSA/PBS and primary antibodies were added for 1h at room temperature. Rabbit anti-claudin-1(1:25), rabbit anti-occludin (1:100) and mouse anti-ZO-1 (1:100) (Invitrogen), and were detected using secondary antibodies (goat anti-mouse Alexa 568 and goat anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen) at 1:300 dilution in 1% BSA/PBS for 1h at room temperature. Coverslips were added to cell monolayers with a fluorescence mounting medium (DABCO). The slides were observed with a confocal microscope (Olympus FV1000 IX81) at 40X and 100X magnifications for TJs proteins and F-actin, respectively.

**Statistical analysis.** All data are presented as the means +/- the standard errors. The statistical significance for resistance data analysis, paracellular permeability and calculation of means was determined by One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by multiple pairwise comparisons with Tukey's posthoc tests. Data were transformed using the arcsinus of square root transformation. Levene' test was used to examine homogeneity of variances. Statistically significant differences were considered at  $P < 0.05$

## RESULTS

**1. Determination of assay parameters.** A wide range of purified STb and STb24-31 peptide concentrations was tested on T84 cell line in a time response manner (data not shown). We selected 20  $\mu\text{g}$  of purified STb and 9  $\mu\text{g}$  of STb24-31 peptide for our assays because they gave us robust, reliable and reproducible results after 24h without being cytotoxic. After seeing that the effects of STb and STb24-31 peptide at these doses were consistent, these concentrations were used throughout this study. In addition, the scrambled peptide and mutated STb (D30V) were tested at the same concentrations.

**2. STb induces a significant reduction in TER of T84 epithelial cells.** The changes in TER were investigated in STb-treated T84 cell monolayers, to characterize the effects of STb on the intestinal barrier function. Purified STb and *E.coli* strain expressing STb were added to the cell monolayers and TER was measured after 24h. Control cell monolayers consist of untreated cell monolayers and cell monolayers infected with a commensal non-toxinogenic *E.coli* strain. After 24h of intoxication with STb, the barrier function of T84 cell monolayer was altered as indicated by a 40% reduction in TER of the monolayers compared to controls (Figure 1A). However, there was a profound drop in TER of T84 cell monolayers following 24h of infection with the *E.coli* expressing STb (PD-20M), where TER was reduced to 10% of the initial value when compared to those infected with the commensal non-toxinogenic *E.coli* strain, which did not affect TER (Figure 1A).

There was no significant difference in TER between untreated cell monolayers and cell monolayers infected with the commensal non-toxinogenic *E.coli* strain. 24h post-incubation with both purified STb and the *E.coli* strain expressing STb, the reduction of TER was statistically significant ( $p < 0.0001$ ) comparatively to control.

**3. STb enhances paracellular permeability of T84 epithelial cell monolayers.** Reduction of TER may result either from disruption of TJ integrity or from physiological modification of ion flux (SchneebergerLynch 2004). To determine if the drop in TER in infected cell monolayers is related paracellular permeability, changes in paracellular permeability across T84 cell monolayers in response to STb and an *E.coli* strain expressing STb were measured using FITC-conjugated BSA. FITC-BSA (4 $\mu$ g) was added to the apical side of cell monolayers which were incubated for 24 hours at 37°C. The capacity of the fluorescent marker to cross the paracellular space was assessed by measuring the fluorescence in the basolateral chamber. As show in Figure 1B, infection of T84 cell monolayers with the *E. coli* strain expressing STb or purified STb exhibited a significant increase in the paracellular permeability for FITC-BSA ( $p < 0.0001$ ) as compared with either monolayers infected with a commensal non-toxinogenic strain or untreated cell monolayers.

**4. An 8 amino acids peptide corresponding to a consensus sequence of *Vibrio cholerae* ZOT toxin is required for epithelial barrier disruption.** The consensus sequence of *V. cholerae* ZOT toxin seems to be responsible for the permeabilizing action on intestinal TJs, by interacting with a specific surface receptor. STb24-31, a synthetic octapeptide (GFLGV RDG) with a shared motif with a consensus sequence of ZOT toxin was synthesized and tested on T84 cell monolayers. A total of 9 $\mu$ g of peptide representing 3 times the STb dose was used. Following incubation with STb24-31, the TER decreased by 35% within 24h (Fig 2A), indicating that it affected the integrity in TJs protein complexes. Non treated cell monolayers showed no change in TER over the same period. Again, cells incubated with STb24-31 peptide resulted in an increased flux of FITC-BSA from the apical to basolateral chamber when compared with the control (Fig 2B).

Both changes in TER and the capacity of STb24-31 peptide to allow paracellular transport of markers were statistically significant ( $P < 0.0001$ ).

**5. F-actin organization is affected by STb.** Following treatment for 24h with STb, T84 cell monolayers were fixed, permeabilized and stained with FITC-phalloidin to highlight the F-actin organization. While control T84 cell monolayers had well organized F-actin filaments and stress fibers (Fig 3A, C and Fig 4A, C), the STb treated cell monolayers exhibited disruption and condensation of F-actin filaments and stress fibers (Fig 3G, F). STb24-31 peptide also affected F-actin organization, showing loss of stress fibers and disorganization of F-actin without actin condensation compared to STb (Fig 4G, I). However, mutated STb (D30V) and the scrambled peptide compared to wild type STb and STb24-31 peptide had no effects on F-actin (Fig 3D, F and Fig 4D, F). As judged by nuclei staining with DAPI, characteristic nuclei changes in morphology and size were observed in both STb and STb24-31 peptide treated cells (Fig 3H and Fig 4H) compared to negative control (Fig 3B, E and Fig 4B, E). This is one of the structural changes of pre-apoptosis consisting of chromatin condensation followed by their fragmentation (Syed et Dubreuil, 2012).

**6. STb causes disassembly of tight junction proteins and modification of cellular morphology in T84 epithelial cells.** Confocal microscopy investigations of the distribution of tight junction transmembrane and cytoplasmic proteins were done. Negative control monolayers stained for ZO-1, occludin and claudin-1 showed a brightly stained continuous band around each cells (Fig 5A, B, C and Fig 6A, B, C). After a 24 h period of treatment with STb, the distribution of ZO-1 and occludin were altered. Cells appeared enlarged and elongated compared to untreated cells and occludin was redistributed from the lateral membrane to an intracellular location (Fig 5G, H). The reorganization of claudin-1 was observed as a complete fragmentation of cell boundaries (Fig 5I). Following treatment with STb24-31 peptide, similar effects on the reorganization of ZO-1 and occludin were observed (Fig: 6G, H), whereas claudin-1 were lost from cell-cell contact sites: seen as fragmentation of the brightly stained cell boundaries, with areas of low and high intensity,



indicating a loss and redistribution of claudin-1 (Fig 6I). In contrast, no change in TJ proteins distribution was seen with mutated STb and the scrambled peptide (D30V) compared to wild type STb and STb24-31 peptide (Fig 5D, E, F and 6D, E, F).

## DISCUSSION

Epithelial tight junctions can be altered by various pathogens, as well as the toxins they elaborate. These effects may result from direct modification of TJ proteins (occludin, claudins and ZO-1, ZO-2 and ZO-3, etc...), and/or by alteration of the perijunctional actin filaments. In this study, we demonstrated for the first time that STb induces barrier dysfunction of T84 cell monolayers. Our data indicate that incubation of T84 monolayers with either purified STb or an *E.coli* strain expressing STb (PD-20M), as well as STb24-31 peptide corresponding to a consensus sequence of *V.cholerae* ZOT toxin induces a significant reduction in TER and an increase in paracellular permeability. These changes were associated with marked changes of F-actin organization in both STb and STb24-31 peptide treated cells. TJs disruption was seen as redistribution and/or fragmentation of tight junction proteins (ZO-1, occludin and claudin-1). We observed that STb24-31 alters biological characteristics of tight junctions and thus binding to sulfatide is occurring as it is required for STb biological activity.

Immunofluorescence confocal microscopy showed changes and reorganization of tight junction proteins ZO-1 and occludin in both STb toxin and STb24-31 peptide treated cells compared to control. Similar changes of ZO-1 and occludin have been observed with T84 infected with enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042 (Strauman et al., 2010). Similar to what Chen et al (2006) observed with Caco-2 cell monolayers infected with *Campylobacter jejuni*, STb treated T84 cell monolayers resulted in the redistribution of occludin from the lateral to an intracellular location (Chen et al., 2006). While STb24-31 peptide treated cells exhibited loss and redistribution of claudin-1 from cell-cell contact sites as seen with Caco-2 cells treated with ZOT (Schmidt et al., 2007), we observed an important disruption of claudin-1 arrangement in STb treated cells.

A similar phenomenon was reported in T84 cells exposed to *C. difficile* toxin A (Chen et al., 2002).

To date, it is known that claudins represent a large family of proteins which are the major gate keepers of the paracellular pathway (Abuazza et al., 2006). Thus the loss of claudin-1 from tight junctions in response to STb toxin may explain the effect observed on paracellular permeability and barrier function. Several pathogens and their toxins, including *E.coli* strain C25, *C. difficile* toxin A and *V.cholerae* ZOT toxin cause redistribution of claudin-1 paralleled to an increase in paracellular permeability.

In general, the effect of STb on the cytoskeletal structure and TJ proteins disruption somehow were similar to the modifications reported to be induced by *C. difficile* toxin A (Fiorentini and Thelestam, 1991). Although, a similar effect was observed for ZOT, major differences were noticed. In fact, ZOT provokes a reversible effect (2-3h) on cytoskeletal rearrangement and TJ proteins disruption, while STb causes changes that seem to be irreversible over the time period our experiments were conducted (24h).

TJ structure and function are regulated by the perijunctional actinomyosin ring (Turner, 2000), and actin stress fibers have been shown to be involved in regulation of TJ assembly and function (Rajasekaran et al., 2003). Interestingly, an increased permeability with a significant drop of TER caused by STb were associated with a disruption and condensation of F-actin filaments and stress fibers. Additionally, the effect of STb on TJ proteins and cytoskeleton is specific as demonstrated by the absence of change observed with mutated STb (D30V) and the scrambled peptide compared to wild type STb and STb24-31.

TJ proteins alterations caused by STb may be due to actin rearrangement, as a loss of organization in perijunctional F-actin ring has been identified to be a critical event in the mechanism of lowered TER and increased paracellular permeability (Nusrat et al., 1995). Even if little is known about the molecular mechanisms underlying tight junctional physiology, protein kinases are thought to be involved in the regulation of tight junction assembly and paracellular permeability changes. For example, both tyrosine (StuartNigam 1995) and serine/threonine (Citi and Denisenko, 1995),(Sakakibara et al., 1997) protein

phosphorylation changes are known to correlate with permeability changes in existing tight junctions, as well as the assembly of tight junctions. The actin cytoskeleton is composed of a complicated meshwork of microfilaments whose geometry is regulated by various actin binding proteins. Several independent reports have been published on the role of protein phosphorylation in cytoskeletal rearrangement (Tang et al., 1993). One of the actin binding proteins whose state of phosphorylation regulates F-actin linkage to the plasma membrane is the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS). In its nonphosphorylated form, MARCKS cross-links to the membrane and the actin meshwork is associated to the membrane via MARCKS (Hartwig et al., 1992). Activated PKC phosphorylates MARCKS, which dissociate from the membrane (Rosen et al., 1990), and the actin is likely to be spatially separated from membrane and more plastic. When MARCKS is dephosphorylated, it returns to the membrane where it cross-links actin again (Thelen et al., 1991). Therefore, actin organization is regulated through a PKC-dependent phosphorylation process.

Like most TJ proteins, occludin is also a phosphoprotein known to have an important role in the tight junction function, and *in vivo* it is likely phosphorylated on serine and threonine residues (Sakakibara et al., 1997), (Cordenonsi et al., 1997). Occludin dephosphorylation and ZO-1 phosphorylation are associated with stimulus-induced tight junction disassembly and paracellular permeability changes (Sheth et al., 2003). Activated PKC with TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), stimulates the activity of serine/threonine phosphatase which in turn dephosphorylates occludin resulting in a rapid increase in paracellular permeability evidenced by a decrease in TER, suggesting that dephosphorylation of occludin could be an important step in tight junction regulation (Clarke et al., 2000). On the other hand Banan et al (2005) demonstrated that the PKC- $\theta$  isoform is required for dynamic changes in claudin-1 and claudin-4 isotypes and for permeability function in the intestinal epithelium. The mechanism underlying this unique biological effect of the  $\theta$  isoform of PKC seems to be alterations in the organization, assembly, and/or phosphorylation of claudin isotypes (Banan et al., 2005).

A previous study has shown that binding of STb to its receptor leads to uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  into the cell, activating protein kinase C, which through phosphorylation activates the CFTR (Cystic fibrosis transmembrane regulator). These elevated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels also stimulate synthesis of secretagogues prostaglandin  $\text{E}_2$  and 5-hydroxytryptamine, inducing duodenal and jejunal secretion of water and electrolytes by unknown mechanisms (Harville and Dreyfus, 1995).

Based on the fact that STb activates PKC and its involvement in cytoskeletal rearrangement and TJ regulation, we can hypothesize that PKC signaling pathway could be involved in TJs dysfunction as well as cytoskeletal changes and TJ proteins alterations. Further studies are required to understand the pathways involved in STb mediated alteration of TER and TJs proteins modulation. However, as TER reflects the integrity of cell monolayers (Mukherjee et al., 2004), it is reasonable to report that STb induces the opening of TJ as indicated by the significant loss of TER and a parallel increase of paracellular permeability to a high molecular weight marker, correlated by redistribution of TJ proteins and rearrangement of actin cytoskeleton.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by a Discovery grant from the National Research Council of Canada (#139070) to J.D.D. C.N.M was recipient of various grants from CRIP and the Faculty of Veterinary Medicine (Université de Montréal).

## REFERENCES

- ABUAZZA, G., BECKER, A., WILLIAMS, S. S., CHAKRAVARTY, S., TRUONG, H. T., LIN, F. & BAUM, M.** 2006. Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291**:F1132-1141.
- ANDERSON, J. M., BALDA, M. S. & FANNING, A. S.** 1993. The structure and regulation of tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:772-778.
- BALKOVETZ, D. F. & KATZ, J.** 2003. Bacterial invasion by a paracellular route: divide and conquer. *Microbes. Infect.* **5**:613-619.
- BANAN, A., ZHANG, L. J., SHAIKH, M., FIELDS, J. Z., CHOUDHARY, S., FORSYTH, C. B., FARHADI, A. & KESHAVARZIAN, A.** 2005. Theta isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isotypes: a novel mechanism for regulation of permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**:962-982.
- BEAUSOLEIL, H. E., LÉPINE, F. & DUBREUIL, J. D.** 2002. LC-MS analysis of pig intestine sulfatides: Interaction with *Escherichia coli* STb enterotoxin and characterization of molecular species present. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**:183–188.
- BERKES, J., VISWANATHAN, V. K., SAVKOVIC, S. D. & HECHT, G.** 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut.* **52**:439-451.
- CHEN, M., POTHOUAKIS, C. & LAMONT, T.** 2002. Protein Kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to *Clostridium difficile* Toxin A. *J. Biol. Chem.* **277**:4247– 4254.
- CHEN, M. L., GE, Z., FOX, J. G. & SCHAUER, D. B.** 2006. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **74**:6581-9.

- CITI, S. & DENISENKO, N.** 1995. Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells. *J. Cell Sci.* **108**:2917-2926.
- CLARKE, H., SOLER, A. P. & MULLIN, J. M.** 2000. Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *J. Cell Sci.* **113**:3187-3196.
- CORDENONSI, M., MAZZON, E., DE RIGO, L., BARALDO, S., MEGGIO, F. & CITI, S.** 1997. Occludin dephosphorylation in early development of *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* **110**:3131-3139.
- DI PIERRO, M., LU, R., UZZAU, S., WANG, W., MARGARETTEN, K., PAZZANI, C., MAIMONE, F. & FASANO, A.** 2001. Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J. Biol. Chem.* **276**:19160-19165.
- DREYFUS, L. A., HARVILLE, B., HOWARD, D. E., SHABAN, R., BEATTY, D. M. & MORRIS, S. J.** 1993. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. **90**:3202-3206.
- EDWARDS, R. A., KELLER, L. H. & SCHIFFERLI, D. M.** 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene*. **207**: 149-157.
- FIorentini, C. & THELESTAM, M.** 1991. *Clostridium difficile* toxin A and its effects on cells. *Toxicon*. **29**:543-567.
- GONCALVES, C., VACHON, V., SCHWARTZ, J.-L. & DUBREUIL, J. D.** 2007. The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush Border membrane vesicles. *Infect. Immun.* **75**:2208-2213.
- GUIGNOT, J., CHAPLAIS, C., COCONNIER-POLTER, M. H. & SERVIN, A. L.** 2007. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **9**:204-221.

- HARTWIG, J. H., THELEN, M., ROSEN, A., JANMEY, P. A., NAIRN, A. C. & ADEREM, A.** 1992. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature*. **356**:618-622.
- HARVILLE, B. A. & DREYFUS, L. A.** 1995. Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect. Immun.* **63**:745-750.
- HARVILLE, B. A. & DREYFUS, L. A.** 1996. Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides*. **17**:363-366.
- LABRIE, V., BEAUSOLEIL, H.-E., HAREL, J. & DUBREUIL, J. D.** 2001b. Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology*. **147**:3141-3148.
- LI, Z., ELLIOTT, E., PAYNE, J., ISAACS, J., GUNNING, P. & O'LOUGHLIN E, V.** 1999. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* can impair T84 cell structure and function without inducing attaching/effacing lesions. *Infect. Immun.* **67**:5938-5945.
- MUKHERJEE, T., SQUILLANTEA, E., GILLESPIEB, M. & SHAO, J.** 2004. Transepithelial electrical resistance is not a reliable measurement of the Caco-2 monolayer integrity in Transwell. *Drug Deliv.* **11**:11-18.
- NAGY, B. & FEKETE, P. Z.** 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* **30**:259-284.
- NAGY, B. & FEKETE, P. Z.** 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**:443-454.
- NUSRAT, A., GIRY, M., TURNER, J. R., COLGAN, S. P., PARKOS, C. A., CARNES, D., LEMICHEZ, E., BOQUET, P. & MADARA, J. L.** 1995. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. **92**:10629-10633.
- NUSRAT, A., VON EICHEL-STREIBER, C. & TURNER, J.** 2001. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect. Immun.* **69**:1329-1336.

- PETERSON, J. W. & WHIPP, S. C.** 1995. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:1452-1461.
- PHILPOTT, D. J., MCKAY, D. M., MAK, W., PERDUE, M. H. & SHERMAN, P. M.** 1998. Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. *Infect. Immun.* **66**:1680-1687.
- PHILPOTT, D. J., MCKAY, D. M., SHERMAN, P. M. & PERDUE, M. H.** 1996. Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am. J. Physiol.* **270**:G634-645.
- ROSEN, A., KEENAN, K. F., THELEN, M., NAIRN, A. C. & ADEREM, A.** 1990. Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *J. Exp. Med.* **172**:1211-1215.
- ROUSSET, E., HAREL, J. & DUBREUIL, J. D.** 1998. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect. Immun.* **66**:5650-5658.
- SAKAKIBARA, A., FURUSE, M., SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y., & TSUKITA, S.** 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell Biol.* **137**:1393-1401.
- SAWADA, N., MURATA, M., KIKUCHI, K., OSANAI, M., TOBIOKA, H., KOJIMA, T. & CHIBA, H.** 2003. Tight junctions and human diseases. *Med. Electron. Microsc.* **36**:147-156.
- SCHMIDT, E., KELLY, S. M. & VAN DER WALLE, C. F.** 2007. Tight junction modulation and biochemical characterisation of the zonula occludens toxin C- and N-termini. *FEBS Lett.* **581**: 2974-2980.
- SCHNEEBERGER, E. E. & LYNCH, R. D.** 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**:C1213-1228.



- SHETH, P., BASUROY, S., LI, C., NAREN, A. P. & RAO, R. K.** 2003. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J. Biol. Chem.* **278**:49239-49245.
- STRAUMAN, M. C., HARPER, J. M., HARRINGTON, S. M., BOLL, E. J. & NATARO, J. P.** 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions. *Infect. Immun.* **78**:4958-4964.
- STUART, R. O. & NIGAM, S. K.** 1995. Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. **92**:6072-6076.
- SUKUMAR, M., RIZO, J., WALL, M., DREYFUS, L. A., KUPERSZTOCH, Y. M. & GIERASCH, L. M.** 1995. The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Prot Sci.* **4**:1718-1729.
- SYED, H. C. & DUBREUIL, J. D.** 2012. *Escherichia coli* STb toxin induces apoptosis in intestinal epithelial cell lines. *Microb. Pathog.* **53**:147-153
- TANG, D. G., TIMAR, J., GROSSI, I. M., RENAUD, C., KIMLER, V. A., DIGLIO, C. A., TAYLOR, J. D. & HONN, K. V.** 1993. The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE, induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **207**:361-375.
- THELEN, M., ROSEN, A., NAIRN, A. C. & ADEREM, A.** 1991. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature.* **351**:320-322.
- TURNER, J. R.** 2000. 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**:301-308.
- VU-KHAC, H., HOLODA, E., PILIPCINEC, E., BLANCO, M., BLANCO, J. E., DAHBI, G., MORA, A., LOPEZ, C., GONZALEZ, E. A. & BLANCO, J.** 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Vet. J.* **174**:176-187.
- YUHAN, R., KOUTSOURIS, A., SAVKOVIC, S. D. & HECHT, G.** 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* **113**:1873-1882.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. STb produces a decrease in T84 transepithelial electrical resistance (TER) and an increase in paracellular permeability.**(A)Confluent cell monolayers were treated with 20µg of purified STb, PD-20M and commensal strains (MOI=20). BSA-FITC was applied to the apical chamber and TER was measured after 24h. Both purified STb and PD-20M strain caused a significant reduction in TER. Data reported are mean percent of initial TER  $\pm$  SD, N=3.  $P < 0.0001$  for purified STb and PD-20M strain compared with control and the commensal *E.coli* strain. Control consisted of untreated cell monolayers. (B)T84 monolayers were treated as described above and BSA-FITC flux (fluorescence in arbitrary units) from apical chamber to basolateral chamber were measured after 24h. STb and PD-20 M produced an increased paracellular flux.  $P < 0.0001$  for STb and PD-20M compared with control and the commensal *E.coli* strain.

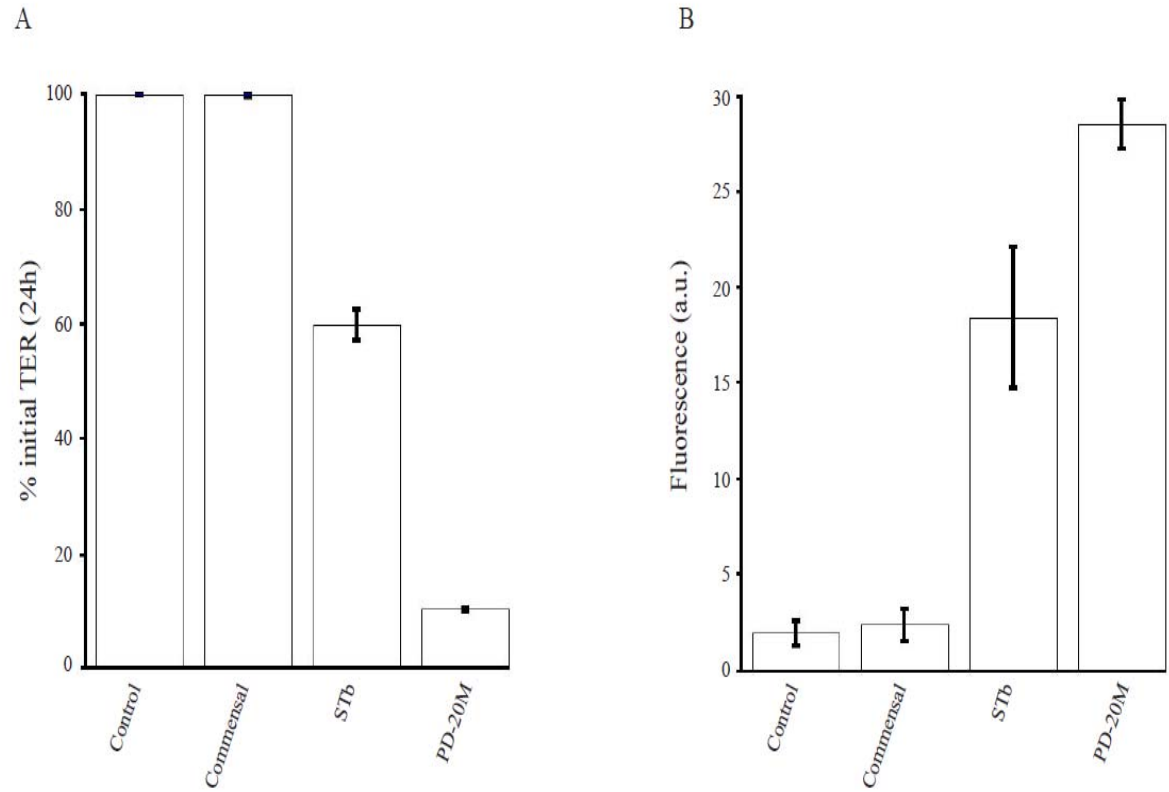
**Figure 2. The STb24-31 peptide produces a decrease in T84 transepithelial electrical resistance (TER) and an increase in paracellular permeability.**(A)Confluent cell monolayers were treated with STb24-31 peptide (9µg) and TER was measured after 24h. STb24-31 peptide caused a significant reduction in TER. Data reported are mean percent of initial TER  $\pm$  SD, N=3.  $P < 0.0001$  for STb24-31 peptide compared with control. Control consisted of untreated cell monolayer. (B)T84 cell monolayers were treated as described above and BSA-FITC was applied to the apical chamber. The flux from apical to basolateral chamber was measured after 24h. STb24-31 peptide produced an increased paracellular flux.  $P < 0.0001$  for STb 24-31 compared with the control.

**Figure 3. STb enterotoxin influences F-actin organization in T84 intestinal epithelial cells.** After a 24 h period of treatment, T84 cells were fixed, permeabilized and stained with FITC-phalloidin to visualize F-actin filaments. F-actin distribution in control cells showed well organized stress fibers with regular cell limits (A, C, D, F). The arrows show dissolved and condensed F-actin and central stress fibers in STb treated cells (G, I). As judged by nuclei staining with DAPI, characteristic nuclei changes in morphology and size were observed in STb treated cells (H) compared with the negative control (B, E).

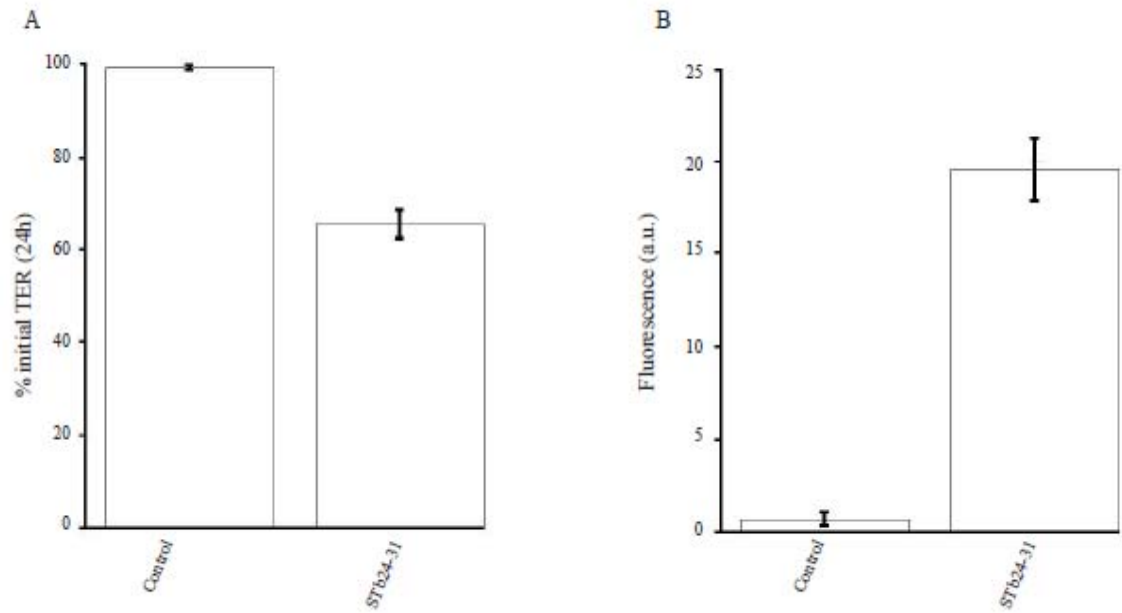
**Figure 4. STb24-31 peptide influences F-actin organization in T84 intestinal epithelial cells.** After a 24 h period of treatment, T84 cells were fixed, permeabilized and stained with FITC-phalloidin to visualize F-actin filaments. F-actin distribution in control cells showed well organized F-actin stress fibers with regular cell limits (A, C, D, F). STb24-31 peptide caused redistribution of F-actin, with dissolution of central stress fibers (G, I). As judged by nuclei staining with DAPI, characteristic nuclei morphology and size changes were observed in STb24-31 peptide treated cells (E) compared with the negative control (B, E).

**Figure 5. Effects of STb on tight junction structural proteins.** After a 24 h period of treatment, T84 cells were fixed, permeabilized and incubated with antibodies against ZO-1, occludin and claudin-1. The Secondary antibodies coupled to Alexa 488 (green, occludins and claudins) and Alexa 586 (red, ZO-1) were then added. Negative control stained for ZO-1, occludin and claudin-1 showed a continuous band circumventing each cell (A, B, C, D, E, F). The distribution of ZO-1 and occludin in STb treated cells were altered (G, H)(white arrow) and occludin was redistributed from the lateral membrane to an intracellular location (red arrow). The reorganization of claudin-1 was observed as fragmentation of the cell boundary following treatment with STb (I) (white arrow).

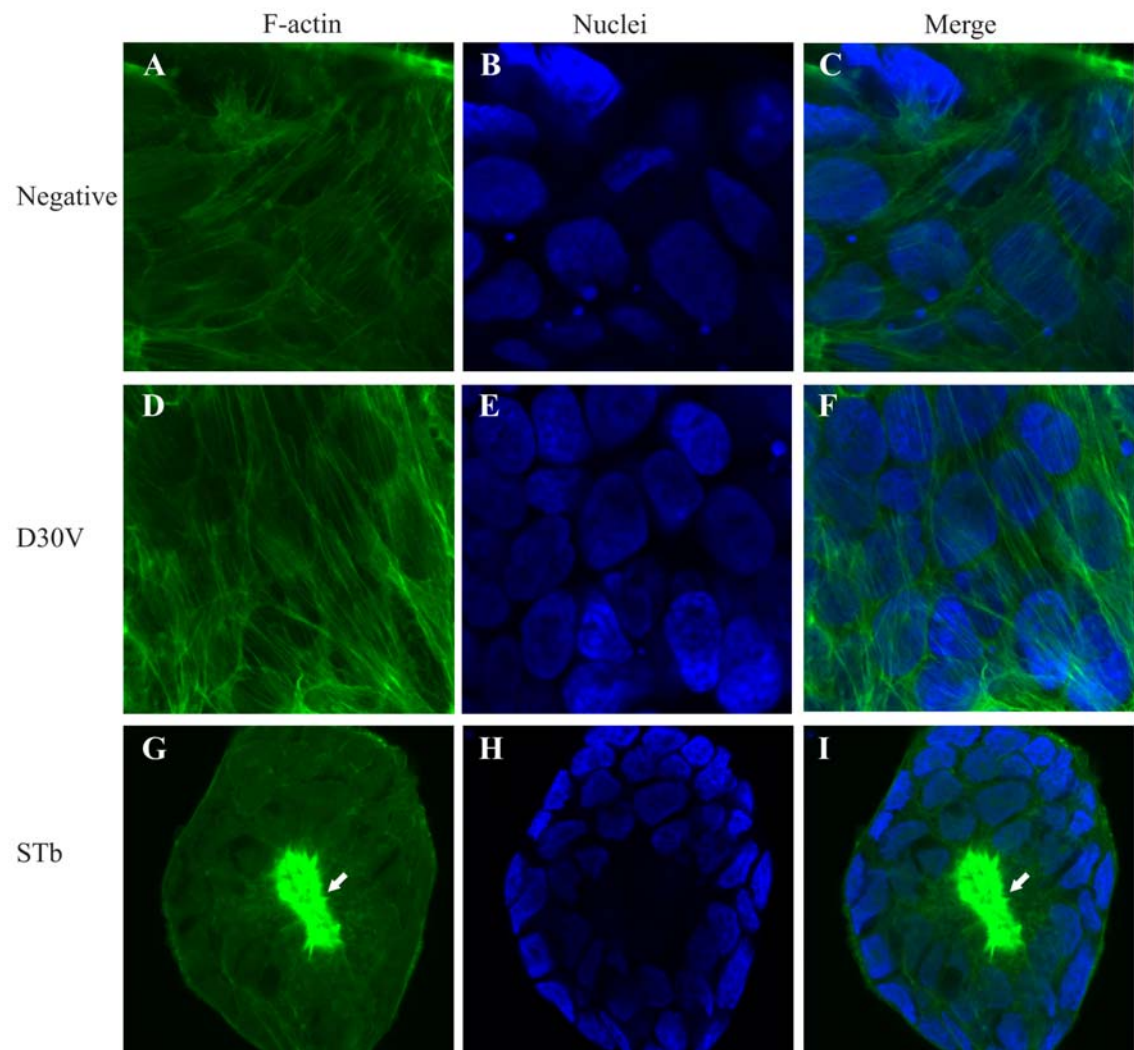
**Figure 6. Effects of STb24-31 peptide on tight junction structural proteins.** After a 24 h period of treatment, T84 cells were fixed, permeabilized and incubated with antibodies against ZO-1, occludin and claudin-1. Secondary antibodies were coupled to Alexa 488 (green, occludin and claudin-1) and Alexa 586 (red, ZO-1) were then added. Negative control stained for ZO-1, occludin and claudin-1 showed continuous lines at cell boundaries (A ,B ,C ,D ,E ,F). The distributions of ZO-1 and occludin were altered (G, H) (white arrow) and occludin was redistributed from the lateral membrane to an intracellular location (red arrow). Claudin-1 was lost from cell-cell contact sites in STb24-31 peptide treated cells (I) (white arrow).

**FIGURES**

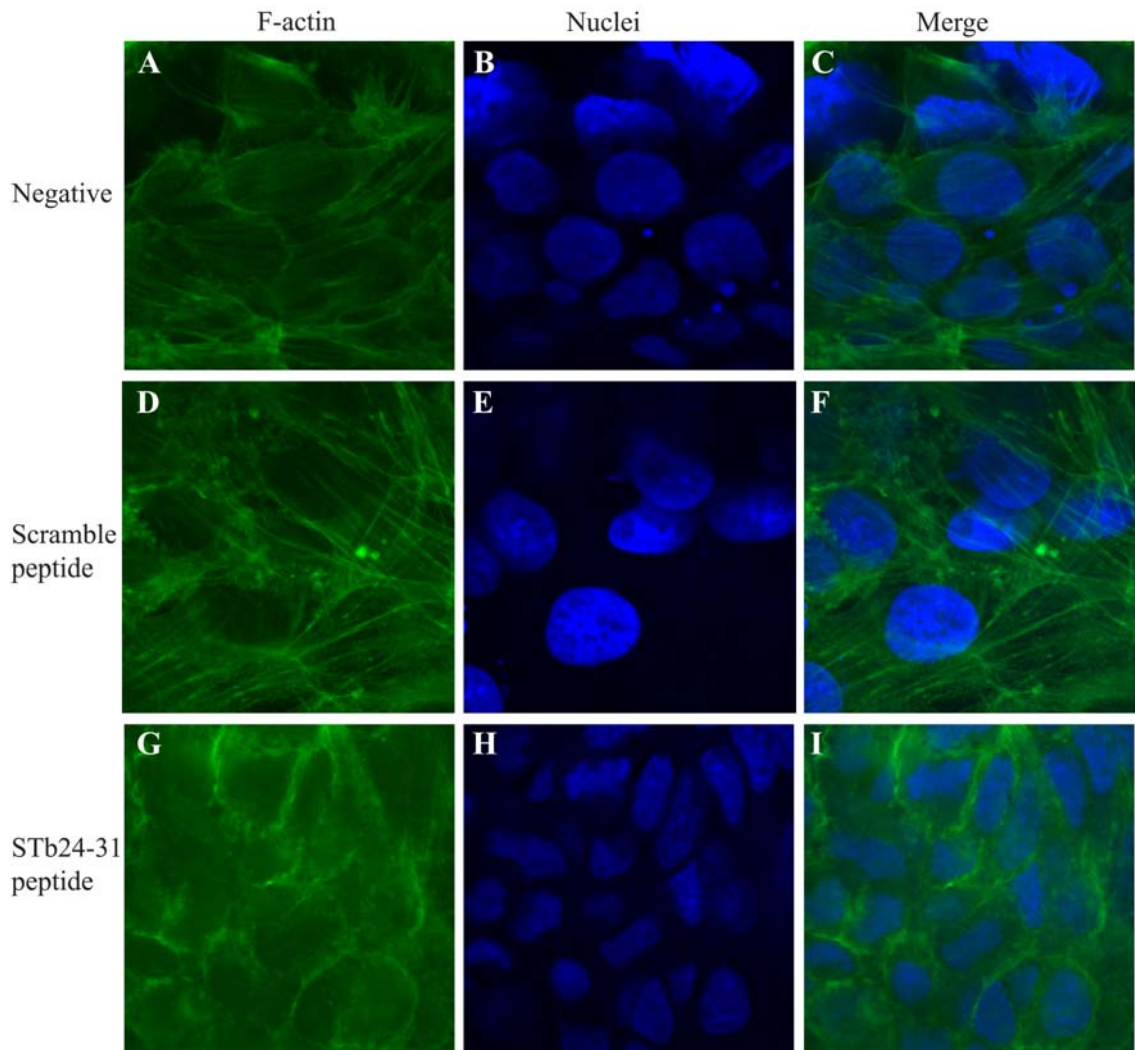
**Figure 1:** STb produces a decrease in T84 transepithelial electrical resistance (TER) and an increase in paracellular permeability



**Figure 2:** The STb24-31 peptide produces a decrease in T84 transepithelial electrical resistance (TER) and an increase in paracellular permeability

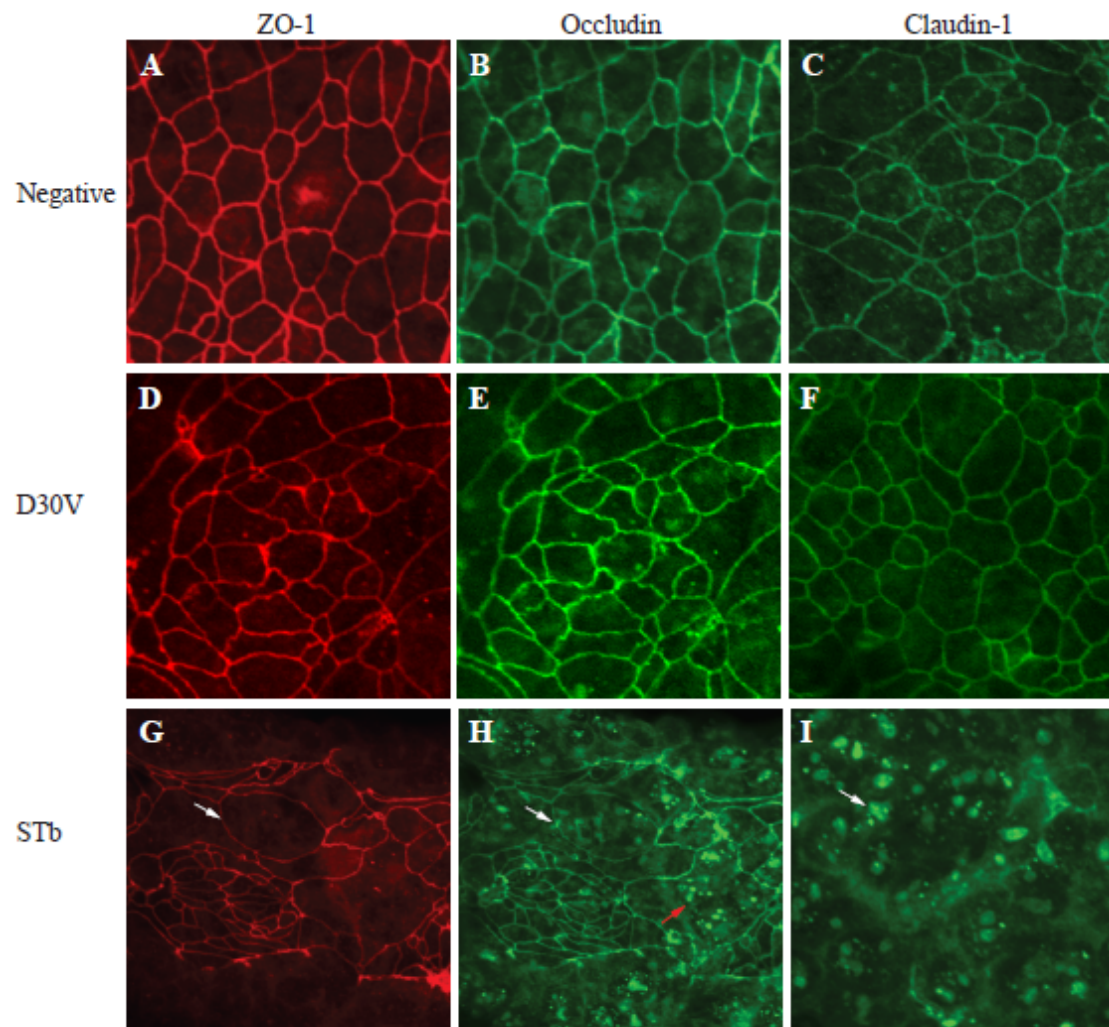


**Figure 3:** STb enterotoxin influences F-actin organization in T84 intestinal epithelial cells.

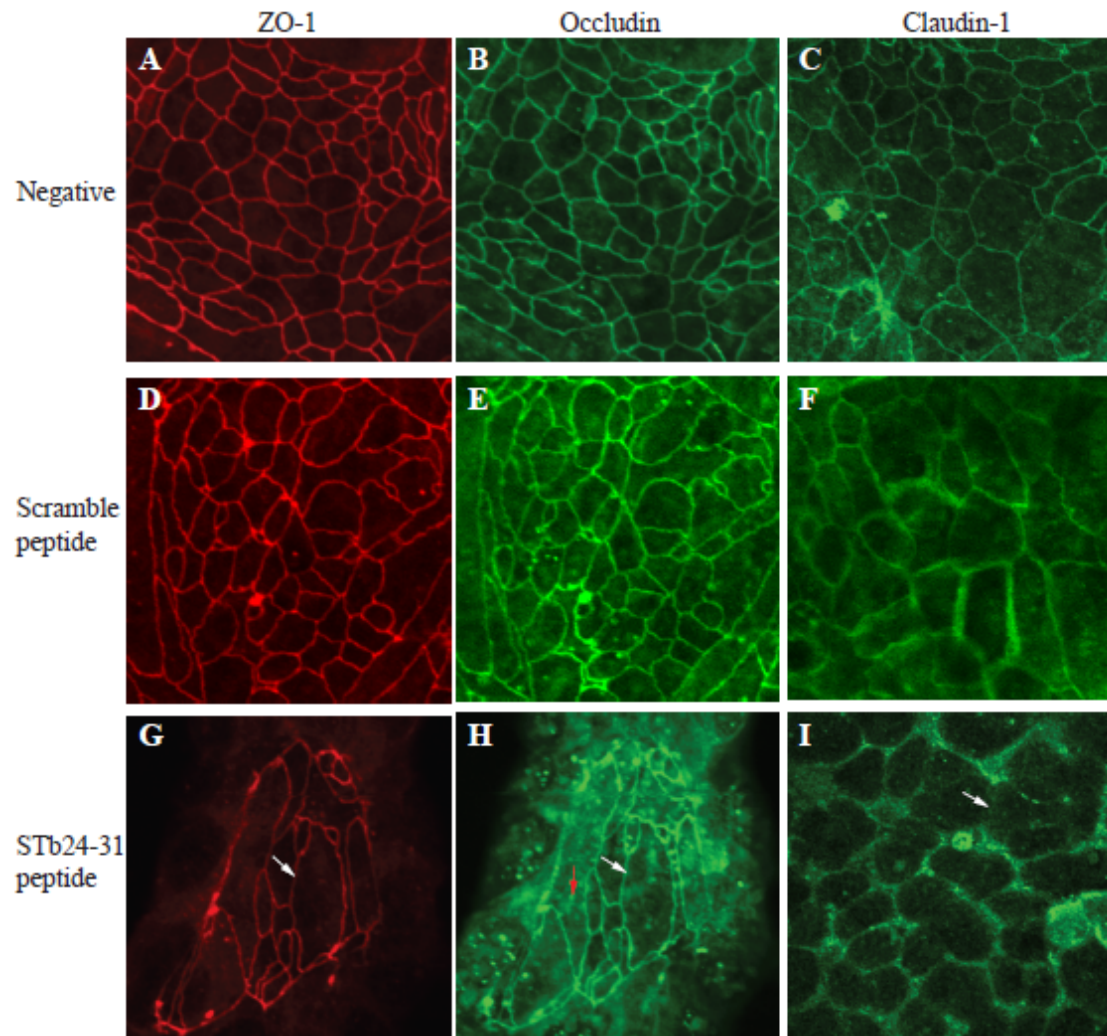


**Figure 4:** STb24-31 peptide influences F-actin organization in T84 intestinal epithelial cells.





**Figure 5:** Effects of STb on tight junction structural proteins.



**Figure 6:** Effects of STb24-31 peptide on tight junction structural proteins.

## **DISCUSSION**

## 1. La perméabilité et la résistance transépithéliale

La formation des jonctions serrées s'accompagne du développement de la résistance électrique transépithéliale et de la restriction de la perméabilité aux traceurs macromoléculaires. Ces deux paramètres sont utilisés pour caractériser les épithéliums. Souvent, une augmentation de la perméabilité paracellulaire se traduit par une baisse de la résistance transépithéliale et le passage de molécules marquées et d'éléments radioactifs. Ceci indique une ouverture des jonctions serrées et une rupture de l'intégrité de la voie paracellulaire. Une augmentation de la perméabilité paracellulaire induite par *H. pylori* a été constatée, exprimée par une diminution de la résistance électrique et une augmentation du flux de mannitol à travers les monocouches de cellules (Terres et al., 1998). De plus, une étude morphologique a permis de visualiser des modifications au niveau des jonctions serrées intercellulaires des cellules Caco2 exposées à *H. pylori*. *In vitro* sur des cellules Caco2 et des cellules épithéliales de rein de chien MDCK, différentes études s'accordent à dire que la protéine non-structurale (NSP4) du rotavirus altère la distribution des protéines claudine-1 et occludine des jonctions serrées, entraînant, avant toute lyse cellulaire, l'augmentation de la perméabilité transépithéliale à des molécules de taille de moins de 4 kDa (Tafazoli et al., 2001). On ne peut oublier que certaines bactéries ainsi que les toxines bactériennes altèrent la structure de l'actine filamenteuse de la cellule épithéliale, ce qui peut modifier la perméabilité paracellulaire. Dans la plupart des études, l'hyperperméabilité paracellulaire semble corrélée à une diminution de la résistance transépithéliale associée à une destruction des jonctions serrées (Nusrat et al., 2001; Chen et al., 2006). Il semble que l'absence de réorganisation des filaments d'actine du cytosquelette peut expliquer l'absence de la réduction de la résistance transépithéliale (Schmidt et al., 2007). Dans notre étude, nous avons démontré que l'entérotoxine STb exerce un effet sur la modulation de la perméabilité des jonctions serrées.

Comparativement à d'autres études, l'incubation des monocouches des cellules épithéliales intestinales humaines (T84) avec soit STb purifiée, la souche *E.coli* exprimant STb (PD20M) ou le peptide STb24-31 correspondant à la séquence consensus de la toxine ZOT de *V.cholerae*, a induit une augmentation de la perméabilité au BSA-FITC (66 kDa) associée à une diminution de la résistance transépithéliale. Au contraire, les cellules non traitées et les cellules infectées par la souche commensale d'*E.coli* n'ont manifesté aucun changement sur la perméabilité paracellulaire et la TER. Comme la TER et la perméabilité paracellulaire reflètent l'intégrité de monocouches cellulaires (Mukherjee et al., 2004), ces modifications de TER et de perméabilité laisse supposé l'ouverture des jonctions serrées et le réarrangement du cytosquelette d'actine par STb.

## **2. Régulation des jonctions serrées**

Le rôle et la composition des jonctions serrées sont partiellement connus (Balda et al., 1992). Elles constituent une barrière semi-perméable aux différentes molécules et ainsi une vraie frontière entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur de l'organisme (Claude, 1978). La structure moléculaire des jonctions serrées est restée longtemps inconnue. Aujourd'hui, nous connaissons un nombre important, mais probablement non exhaustif, des protéines composant les jonctions serrées. Parmi elles, les mieux connues sont la *Zonula occludens* -1 (ZO-1), la *Zonula occludens* -2 (ZO-2), l'occludine et la *zonula occludens* -3 (ZO-3), JAM (« junctional adhesion molecule ») et les claudines découvertes récemment (Anderson 2001). ZO-1, ZO-2 et ZO-3 sont des protéines cytoplasmiques alors que l'occludine, les claudines et JAM sont des protéines transmembranaires (Fanning et al., 1999). ZO-1 agit donc comme un lien entre les composants transmembranaires des jonctions serrées, l'occludine et le cytosquelette. Cette interaction entre les jonctions serrées et le cytosquelette est cruciale pour la modulation de la perméabilité paracellulaire. Elle explique pourquoi les modifications du cytosquelette peuvent altérer la perméabilité paracellulaire, et à l'inverse, les agents qui modifient les jonctions serrées altèrent le cytosquelette et le trafic intracellulaire (Madara et al., 1987).

La perte de ZO-1 peut déclencher la réduction de la fonction barrière des jonctions serrées. Comme ZO-1 se lie à l'extrémité carboxyl des claudines (Itoh et al., 1999), il est possible que la translocation de ZO-1 entraîne une perte de contact des claudines entre les cellules adjacentes, ce qui résulterait en une perte de la TER. L'occludine est localisée au niveau des contacts entre les jonctions serrées et constitue l'élément intégral des fibres formant ces jonctions. Son rôle est de favoriser l'adhérence des cellules entre elles, et aussi de réguler la perméabilité paracellulaire à travers l'épithélium (McCarthy et al., 1996). L'occludine est impliquée dans le maintien de l'étanchéité des jonctions serrées et il existe une corrélation positive entre la quantité d'occludine exprimée et la résistance électrique de l'épithélium (Hirase et al., 1997). Les claudines constituent une nouvelle famille de protéines trans-membranaires, comprenant au moins 20 membres (Heiskala et al., 2001), qui constituent un élément structural important des jonctions serrées et jouent un rôle majeur dans la préservation de l'intégrité des épithéliums et dans la modulation de la perméabilité paracellulaire (Kubota et al., 1999). Certains médiateurs, par exemple les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , la PKC, le Mitogen Activated Kinase (MAK), la phospholipase de type C sont impliqués dans la formation et l'intégrité des jonctions serrées régulant par la suite la perméabilité paracellulaire (Bazzoni, 2006). L'expression de formes actives de RhoA (Rho GTPases) dans les cellules MDCK cause la désorganisation des jonctions serrées et une désorganisation anarchique de l'occludine et de ZO-1 (Jou et al., 1998). Il a été reporté que la phosphorylation des protéines des jonctions serrées serait corrélée avec la désorganisation des jonctions serrées. On suppose que la phosphorylation change la conformation des protéines altérant donc leur capacité à interagir entre elles et/ou avec le cytosquelette d'actine, ce qui déstabiliserait les complexes jonctionnels et induirait une augmentation de la perméabilité. Cependant, certaines kinases tel que PKC, kinase Src, caséine kinase 2, tyrosines kinases, MAP kinases jouent un rôle important dans la régulation de l'état de la phosphorylation des protéines constitutives des jonctions serrées (Mehta et Malik, 2006).

Au cours de notre étude, nous avons également testé l'effet de STb sur les protéines des jonctions serrées, après avoir constaté que STb était capable de modifier la perméabilité et la TER des jonctions serrées. La microscopie confocale a montré les changements morphologiques et la réorganisation des protéines des jonctions serrées (ZO-1 et occludine) dans les cellules traitées par STb purifié et le peptide STb24-31. Les mêmes effets ont été constatés avec les cellules T84 infectées par une souche d'*E.coli* entéroaggrégative (souche 042), par l'implication de son fimbriae d'adhérence aggrégatif II (AAF/II) (Strauman et al., 2010).

L'entérotoxine STb a également entraîné la redistribution de l'occludine de la membrane latérale à intérieur des cellules, et ceci avait aussi été remarqué avec les monocouches de Caco-2 infectées par *Campylobacter jejuni* (Chen et al., 2006). Les claudines-1 sont détruites d'une façon importante après le traitement des cellules T84 avec STb, un phénomène qui avait été observé pour les cellules T84 exposées à la toxine A de *C. difficile* (Chen et al., 2002). Par contre, avec le peptide STb24-31, une perte et une redistribution des claudines-1 ont été observées. Des résultats similaires ont été obtenus chez les cellules Caco-2 traitées par la toxine ZOT (Schmidt et al., 2007). Bien que, nous n'avons pas vérifié les mécanismes moléculaires par lesquels STb affecte les protéines des jonctions serrées, nos résultats démontrent pour la première fois que STb est capable d'induire le dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale via l'altération des protéines des jonctions serrées. Ces changements au niveau des protéines des jonctions serrées pourraient expliquer l'augmentation de la perméabilité paracellulaire et la réduction de la résistance transépithéliale causées par STb qui expliqueraient, du moins en partie, la diarrhée sécrétoire associée à une intoxication par STb.

### 3. Modulation de la perméabilité paracellulaire via le cytosquelette d'actine

Le complexe jonctionnel, responsable de la perméabilité intestinale paracellulaire, est une structure dynamique contrôlée en partie par l'activité du cytosquelette (Schneeberger et Lynch, 1992). Le cytosquelette d'actine joue un rôle crucial dans l'établissement et le maintien de l'intégrité des jonctions serrées. Une augmentation de la perméabilité peut résulter de l'accroissement de l'espace intercellulaire causé par la contraction ou la rétraction des cellules. Les fibres de stress sont des faisceaux de polymères d'actine qui interagissent avec la myosine, engendrant une contraction cellulaire. La formation des fibres de stress corrèle avec un changement de forme cellulaire et favorise la formation d'espaces intercellulaire, tout en augmentant la perméabilité paracellulaire. Les fibres de stress jouent également un rôle dans l'assemblage et la fonction des jonctions serrées (Rajasekaran, 2003).

La forme de la cellule dépend du cytosquelette, véritable charpente de la cellule. Ainsi la réorganisation des microfilaments d'actine est essentielle au changement de forme de la cellule (van Hinsberghvan et Nieuw Amerongen, 2002). Les facteurs altérant le cytosquelette d'actine peuvent perturber la fonction de barrière épithéliale. Dans la plupart des cas, l'augmentation de la perméabilité est corrélée à une perte de l'actine à la périphérie de la cellule et à une augmentation de la densité des fibres de stress (Mehta et Malik, 2006). Les protéines GTPases (Rho, Rac et Cdc42) affectent directement les protéines des jonctions serrées. Par ailleurs, vu le rôle de Rho, Rac et Cdc42 dans la dynamique du cytosquelette d'actine, et l'importance du cytosquelette dans l'établissement et le maintien de l'intégrité des jonctions serrées, il est probable que les protéines Rho GTPases altèrent également le réseau d'actine-myosine requis pour l'immobilisation de complexes macromoléculaires au niveau des jonctions serrées. À titre d'exemple, les toxines A et B de *C. difficile* exercent leur effets sur la structure et la fonction des jonctions serrées et/ ou le cytosquelette d'actine via l'inactivation des protéines Rho (Nusrat et al., 2001). De plus on sait que la phosphorylation des protéines est impliquée dans le réarrangement du cytosquelette d'actine (Tang et al., 1993).



A titre d'exemple le Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrat (MARCKS), dans sa forme non phosphorylée lie le cytosquelette d'actine à la membrane (Hartwig et al., 1992). Une fois phosphorylée suite à l'activation de PKC, il est dissocié de la membrane causant ainsi la plasticité du cytosquelette (Rosen et al., 1990). Les conséquences seraient le dysfonctionnement des jonctions serrées étant donné qu'elles sont régulées par l'anneau actine-myosine (Turner, 2000) et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire. Étant donné que la redistribution des protéines des jonctions serrées apparaît souvent concomitamment à une désorganisation des filaments d'actine, nous avons jugé important de vérifier l'intégrité du cytosquelette d'actine. Spécifiquement, nos résultats montrent que la redistribution des protéines des jonctions serrées est associée à une destruction des fibres de stress et une condensation des filaments d'actine. Ces modifications sont associées à une augmentation de la perméabilité et la réduction de la TER.

La désorganisation du cytosquelette est un événement critique dans la réduction de la TER et l'augmentation de la perméabilité (Nusrat et al., 1995). La corrélation entre l'augmentation de la perméabilité et la diminution de la TER avec une destruction du cytosquelette d'actine laisse supposer que les changements des protéines des jonctions serrées causés par STb seraient dus au réarrangement du cytosquelette d'actine. À partir de nos résultats, nous avons démontré que STb affecte les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine, ce qui expliquerait l'augmentation de la perméabilité et la réduction de la résistance transépithéliale entraînées par STb. Par contre le mécanisme moléculaire par lequel STb affecte les jonctions serrées et le cytosquelette d'actine reste à élucider. À la lumière de ces résultats nous pouvons également confirmer que les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine forment un complexe hautement régulé pour assurer l'étanchéité des jonctions serrées.

#### **4. Le domaine de liaison au récepteur de STb est essentiel à la perméabilisation des jonctions serrées**

La toxine ZOT se localise dans la membrane externe de *V.cholerae*. La toxine subit le clivage, relâchant un fragment amino-terminal de 33kDa qui reste associé au microorganisme et un peptide carboxy-terminal de 12 kDa sécrété dans la lumière intestinale de l'hôte. Les études de mutations de délétions ont démontré que le peptide sécrété se lie au récepteur de la zonuline et désassemble les jonctions serrées (Di Pierro et al., 2001). Hors STb et ZOT possèdent un motif de 8 acides aminés dans leur domaines de liaison au récepteur, dont 5 de 8 acides aminés sont identiques (**GXLXVXDG**). Pour vérifier l'implication de ce motif dans la perméabilisation des jonctions serrées par STb, un octapeptide nommé STb24-31(GFLGVRDG) était synthétisé et testé sur les cellules épithéliales intestinales humaines T84. Le peptide STb24-31 a induit une diminution de la TER et une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Figure 2), ainsi que la désorganisation des protéines des jonctions serrées (Figure 6) et la destruction des filaments d'actine (Figure 4) tel que observé quand les cellules T84 sont traitées par la toxine STb purifiée. Le peptide aléatoire contenant les mêmes acides aminés que STb24-31 (LGRDGGVF) et la toxine STb mutée (D30V) dont l'activité biologique est moins de 10% par rapport à la toxine sauvage n'ont aucun effet sur les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine (Figures 3, 4, 5 et 6), ce qui confirme la spécificité du domaine de liaison au récepteur et plus précisément le motif de 8 acides aminés dans la perméabilisation des jonctions serrées. Ces résultats sont en accord avec l'étude qui a été réalisée dans notre laboratoire. En effet il a été démontré que les acides aminés chargés (K22, K23, R29 et D30) et les 4 glycines présents dans la boucle de STb jouent un rôle important dans l'attachement de STb au récepteur et dans l'entérotoxicité. Par contre, la substitution de l'aspartate en position 30 par l'alanine ou valine (D30A et D30V) réduit l'entérotoxicité mais l'attachement semble être favorisé (Labrie et al., 2001b). Ces données nous amènent à stipuler que STb doit non seulement s'attacher au récepteur mais aussi doit être internalisé pour exercer un effet sur les jonctions serrées et le cytosquelette d'actine. Ainsi ces acides aminés sont essentiels pour l'expression de l'entérotoxicité.

### 5. Réorganisation des jonctions serrées, apoptose et diarrhée

La toxine STb induit l'apoptose dans les cellules épithéliales intestinales. Récemment, il a été démontré dans notre laboratoire que l'incubation de la toxine STb avec les cellules HRT-18 et IEC-18 entraîne l'activation des caspases -9 et -3 et l'ADN extrait révèle sa fragmentation sur les gels d'électrophorèse. L'apoptose induite par STb se produit par la voie intrinsèque vu que la caspase -8 n'est pas activée (Syed et Dubreuil, 2012). Le changement du potentiel mitochondrial observé supporte aussi la voie intrinsèque d'apoptose (Goncalves et al., 2009). Comparativement à d'autres toxines, on sait que la toxine A de *C.difficile* cause les diarrhées et colites pseudomembranaires (Brettle and Wallace, 1984; (George et al., 1982). La toxine A entraîne la perte d'adhésion et l'arrondissement des cellules (Pothoulakis et Lamont, 2001), mais cause également la destruction des protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine (Nusrat et al., 2001). Ainsi les effets de la toxine A sont liés à sa capacité de catalyser la monoglucosylation des protéines Rho GTPases, une réaction qui inactive ces protéines. Il a été rapporté que la toxine A induit aussi l'apoptose dans les cellules T84 car l'activation des caspases -3, -6, -8 et -9 et la fragmentation de l'ADN sont observées après 24h d'incubation des cellules T84 avec la toxine A. Cette apoptose est médiée par l'inactivation des protéines Rho GTPases. De fait, le blocage de l'activité enzymatique de la toxine A inhibe l'inactivation des protéines Rho GTPases ce qui abolit l'apoptose (Brito et al., 2002). En plus, l'inactivation des protéines Rho par l'exoenzyme C3 de *C.botulinum* induit l'apoptose des lymphocytes (Moorman et al., 1996) et l'activation de Rac et Rho inhibe l'apoptose des cellules hématopoïétiques (Nishida et al., 1999). Les protéines Rho GTPases sont des protéines régulatrices du cytosquelette et des protéines des jonctions serrées. Hors, notre étude a démontré que la toxine STb induit la redistribution des protéines des jonctions serrées et la destruction des filaments d'actine. Ces résultats nous font penser que STb inactive les protéines Rho GTPases et l'inactivation des protéines Rho GTPases pourrait être à la base des effets de STb sur les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette. L'inactivation des protéines Rho GTPases pourrait également être responsable de l'apoptose induite par STb dans les cellules épithéliales intestinales.

En effet, nos données mettent en évidence la condensation du noyau, une étape précédant la fragmentation de l'ADN et les cellules deviennent rondes. Ceci laisse supposer que ces effets sont médiés par l'inactivation des protéines Rho GTPases par STb et que les cellules sont dans un état pré-apoptotique. En apoptose, l'activation des caspases -3 cause le clivage de la pompe Ca-ATPase stimulant l'influx des ions calcium (Schwab et al., 2002) et l'augmentation des ions calciums intracellulaire est un élément important dans l'apparition de diarrhée stimulée par STb (Dreyfus et al., 19993) suite à la sécrétion des ions chlores. Ainsi l'ouverture des jonctions serrées est responsable de la sécrétion d'électrolytes et l'eau à travers l'espace paracellulaire. L'ouverture des jonctions serrées et l'apoptose sont donc deux phénomènes liés, dont l'ouverture des jonctions serrées survient probablement en premier et les deux contribuent à la pathogénèse de diarrhée causée par STb.

## **6. Modèle proposé du mécanisme d'action de STb sur les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine**

Les *E.coli* entérohémorragiques augmentent la perméabilité paracellulaire et diminuent le TER de monocouches de cellules T84. Ces modifications fonctionnelles suivent l'activité élevée de la PKC et peuvent être inhibées par les inhibiteurs de PKC (Philpott et al., 1998). De plus, la toxine A de *C. difficile* cause une translocation de ZO-1 des jonctions serrées vers le cytoplasme. Cette translocation est associée à une augmentation de la perméabilité et une diminution de la TER des cellules T84 après 2-3h de traitement avec la toxine A de *C. difficile*. La distribution et la localisation des protéines des jonctions serrées subissent également une forte désorganisation après 4h. Ces effets, sont bloqués par l'inhibiteur MP-KCP, spécifique au PKC alpha et bêta (Chen et al., 2002). Une protéine de liaison à l'actine (MARCKS) est le substrat majeur de la PKC (Aderem, 1992), dont sa phosphorylation par PKC entraîne sa redistribution de la membrane cytoplasmique vers le cytosol ce qui déstabilise le cytosquelette d'actine. Notons que le MARCKS est également sensible au calcium et la calmoduline.

Ainsi, l'augmentation de la perméabilité dans les cellules épithéliales IEC-18 implique la translocation de la PKC du cytosol vers la membrane où elle phosphoryle certaines protéines des jonctions serrées (Marano et al., 2001), mais MARCKS pourrait aussi être phosphorylé. Il a été constaté qu'une activation élevée de phospholipase C gamma et PKC précède l'altération de la perméabilité paracellulaire et de la TER. Les activateurs de la PKC (diacylglycerol et phorbol esters) augmentent la perméabilité paracellulaire et diminuent la TER (Balda et al., 1993). Ceci laisse supposer que la phosphorylation élevée de PLC gamma pourrait être responsable de l'activité élevée de PKC. Les phospholipases C hydrolysent le phosphatidyl inositol libérant l'inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP3) et le Diacylglycerol (DAG). PKC $\alpha$  est activé soit directement par DAG ou par le calcium intracellulaire libéré via IP3 (Fasano et Nataro 2004).

À ce jour, diverses études fragmentaires nous permettent de proposer un mécanisme d'action de STb impliqué dans l'induction de diarrhées. Nous savons que, la toxine s'oligomérisse, puis se lie à son récepteur et s'internalise via des pores non spécifiques perméables aux ions. À l'intérieur des cellules, STb déstabilise le potentiel mitochondrial et active la protéine G $\alpha$ i3 couplée à un canal calcique membranaire (Dreyfus et al., 1993). Ceci entraîne une augmentation de la concentration en ions calcium dans le cytoplasme, et l'augmentation de calcium intracellulaire initie la régulation des phospholipases A2 et C, qui libèrent l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est à la base de la formation de PGE2 et 5-HT interférant avec l'absorption de Na $^{+}$ . Le canal CFTR est aussi phosphorylé suite à l'activation de PKC par un niveau élevé du calcium intracellulaire. Ce canal permet la sécrétion des ions Na $^{+}$ , Cl $^{-}$  et HCO $_{3}^{-}$  qui entraînent la perte d'eau par osmose et mènent à la diarrhée (Dubreuil, 2006a; Dubreuil, 2008). La comparaison du mécanisme d'action des bactéries ou des toxines affectant les protéines des jonctions serrées et/ou le cytosquelette d'actine avec celui de STb, met en évidence quelques éléments communs, à savoir l'activation de PLC, l'activation de PKC et un niveau intracellulaire élevé de Ca $^{2+}$ .

Ces données nous permettent de suggérer un modèle pour le mécanisme d'action de STb sur les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine. Par une cascade d'événements suivant l'internalisation de STb, la phospholipase C est activée. La phospholipase C va hydrolyser le phosphatidyl inositol, libérant l'inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP3) et le Diacylglycerol (DAG). L'IP3 entraîne la libération du calcium à partir du réticulum endoplasmique et la PKC $\alpha$  est activé soit directement par DAG ou par ces ions calcium intracellulaires. La PKC activée est transloquée du cytoplasme vers la membrane cytoplasmique, où elle phosphoryle les protéines des jonctions serrées (ZO-1, occludine et claudine-1) et les protéines de liaison au cytosquelette d'actine, à titre d'exemple le MARCKS. Ainsi cette phosphorylation serait à la base de la redistribution des protéines des jonctions serrées et le réarrangement des filaments d'actine. La PKC $\alpha$  inactive aussi les protéines Rho GTPases, les protéines régulatrices des protéines des jonctions serrées et du cytosquelette d'actine. Cette inactivation aura comme conséquences la redistribution des protéines des jonctions serrées et la destruction des filaments d'actine. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la perméabilité et la diminution de la TER des jonctions serrées observées après 24h de traitement des cellules T84 avec la toxine STb, une cause de la sécrétion de différents ions via les jonctions serrées.

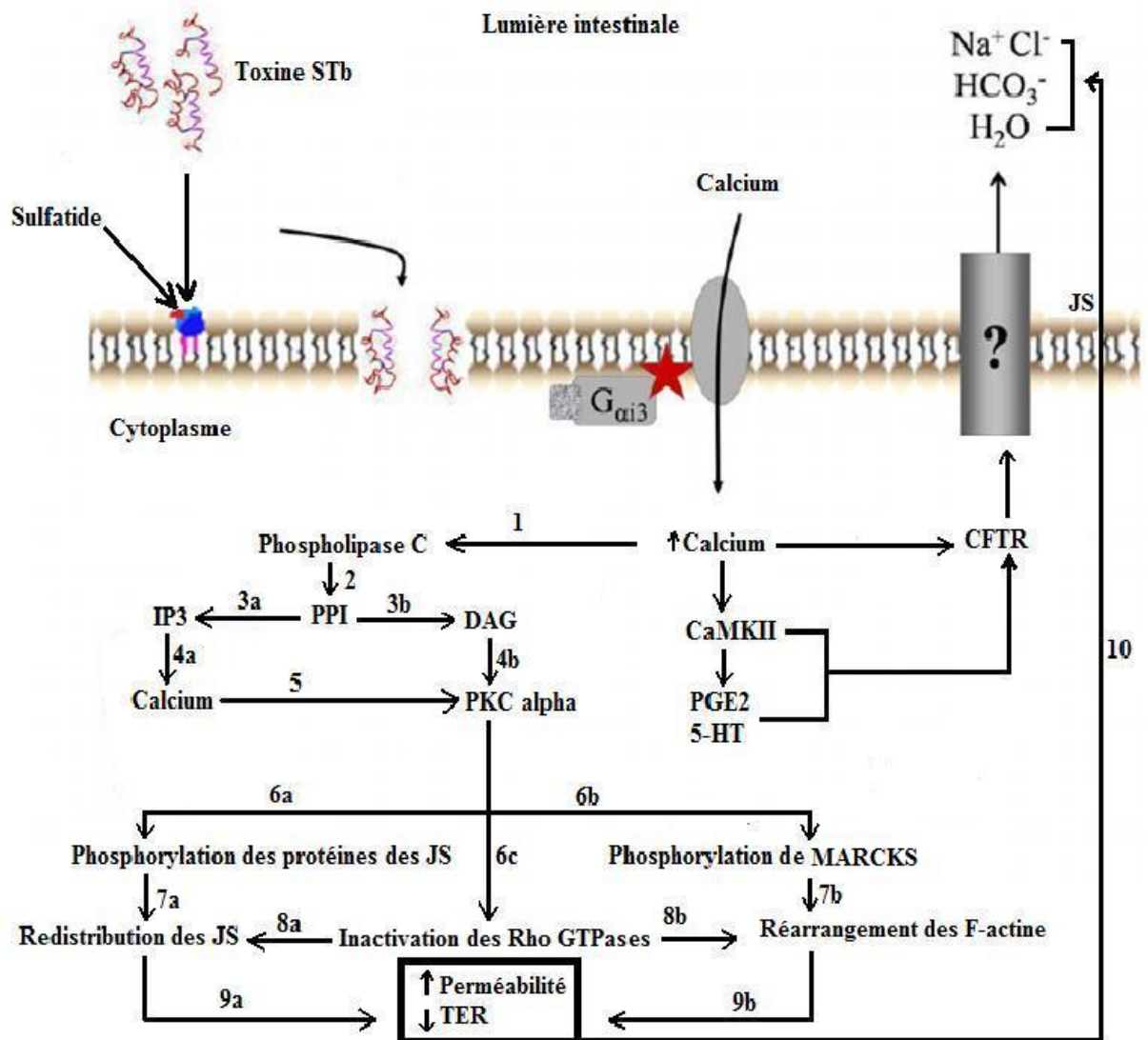


Figure 15: Modèle proposé du mécanisme d'action de STb sur les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette d'actine. STb se lie à son récepteur, puis s'internalise et active la protéine G<sub>ai3</sub> entraînant ainsi la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>. Les ions Ca<sup>2+</sup> activent la phospholipase C (1) qui hydrolyse le PPI (2) en inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP<sub>3</sub>) (3a) et DAG (3b). PKC $\alpha$  est alors activée soit directement par le DAG (4b) ou à travers les ions Ca<sup>2+</sup> (5) relâchés du réticulum endoplasmique par IP<sub>3</sub> (4a).

PKC $\alpha$  à son tour, catalyse la phosphorylation des protéines des JS (6a), les protéines de liaison à la F-actine (MARKCS) (6b) et l'inactivation des protéines Rho GTPases (6c). La phosphorylation des protéines des JS et de MARKCS entraîne la redistribution des protéines des JS (7a) et le réarrangement de la F-actine (7b), deux phénomènes liés à l'inactivation des protéines Rho GTPases (8a et 8b). Par conséquent, la redistribution des protéines des JS et le réarrangement des F-actine impliqueraient l'augmentation de la perméabilité et la diminution de la TER (9a et 9b), avec comme conséquence ultime de la sécrétion de différents ions via les JS (10).



## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les jonctions serrées resserrent l'espace paracellulaire entre les cellules épithéliales adjacentes, limitant ainsi la perméabilité paracellulaire (Balkovelt et Katz, 2003). En situation physiologique, malgré l'étanchéité, l'espace paracellulaire permet la diffusion passive des molécules limitées en taille ( $<1$  kDa)

Par ailleurs, la plupart des protéines des jonctions serrées sont des cibles et/ou des récepteurs des facteurs de virulence exprimés et/ou relâchés par des bactéries, des virus et des parasites. Ainsi l'ouverture des jonctions serrées peut permettre le passage de molécules de grand poids moléculaire ( $<40$  kDa).

L'objectif de cette étude était d'examiner l'effet de l'entérotoxine STb sur les jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales T84. Nos données montrent pour la première fois, que l'entérotoxine STb augmente la perméabilité paracellulaire et diminue la résistance transépithéliale des cellules épithéliales coloniques humaines (T84). Cet effet implique l'altération de la distribution des protéines des jonctions serrées (ZO-1, occludine et claudines), ainsi que la destruction et la condensation du cytosquelette d'actine et en conséquence ouverture des jonctions serrées. Ces résultats suggèrent un effet potentiellement néfaste de l'entérotoxine STb sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale.

Ainsi, nous avons montré que le peptide STb24-31 a les mêmes effets que STb sur les protéines des jonctions serrées et le cytosquelette. Contrairement, le peptide aléatoire et la toxine mutée D30V n'ont manifesté aucun effet sur les jonctions serrées et le cytosquelette d'actine. Et pourtant, les acides aminés chargés et les glycines de la boucle de STb sont importants pour l'entérotoxicité causée par STb, et la toxine mutée D30V réduit l'entérotoxicité à moins de 10% malgré son affinité élevée pour le récepteur de STb (212 % par rapport à la toxine sauvage) (Labrie et al., 2001b). Donc, l'absence d'effets toxiques de la toxine mutée D30V et le peptide aléatoire sur les jonctions serrées et les filaments d'actine nous suggère que l'internalisation de STb est une étape importante pour affecter les jonctions serrées.

Ces données nous laissent supposer que, *in vivo*, l'augmentation de la perméabilité paracellulaire serait une conséquence physiopathologique de STb, suivant la redistribution et/ou la fragmentation des protéines des jonctions serrées et le réarrangement des filaments d'actine. Ceci permettrait d'établir une relation entre le dysfonctionnement de la barrière épithéliale et la diarrhée causée par STb.

Par ailleurs, le mécanisme moléculaire par lequel STb affecte les jonctions serrées ainsi que le rôle joué par ces différents acides aminés conservés dans la boucle de STb restent à élucider. Les inhibiteurs de différentes molécules de signalisations (PKC, PLC,  $\text{Ca}^{2+}$  etc) qui sont activées lors de la désorganisation des jonctions serrées pourront être étudiés. D'autre part, la mutagenèse dirigée permettrait de déterminer l'(les) acide aminé(s) du domaine de liaison au récepteur de STb impliqué(s) dans la perméabilisation des jonctions serrées. En complément, il serait intéressant de développer des modèles *in vivo* pour tester l'effet de l'entérotoxine STb sur les jonctions serrées.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- ABRAHAO, C., CARMAN, R., HAHN, H. & LIESENFELD, O.** 2001. Similar frequency of detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxins in patients with antibiotic-associated diarrhea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:676–677.
- ABUAZZA, G., BECKER, A., WILLIAMS, S. S., CHAKRAVARTY, S., TRUONG, H. T., LIN, F. & BAUM, M.** 2006. Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291**:F1132–1141.
- ADEREM, A.** 1992. Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. *Trends Biochem. Sci.* **17**:438–443.
- AIJAZ, S., SANCHEZ-HERAS, E., BALDA, M. & MATTER, K.** 2007. Regulation of tight junction assembly and epithelial morphogenesis by the heat shock protein Apg-2. *BMC Cell. Biol.* **8**:49.
- AKASHI, N., HITOTSUBASHI, S., YAMANAKA, H., FUJII, Y., TSUJI, T., MIYAMA, A., JOYA, J. E. & OKAMOTO, K.** 1993. Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**:311–315.
- ANDERSON, G. G., DODSON, K. W., HOOTON, T. M. & HULTGREN, S. J.** 2004. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol.* **12**:424–430.
- ANDERSON, J. M.** 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci.* **16**:126–130.
- ANDERSON, J. M., BALDA, M. S. & FANNING, A. S.** 1993. The structure and regulation of tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:772–778.
- ANDO-AKATSUKA, Y., SAITOU, M., HIRASE, T., KISHI, M., SAKAKIBARA, A., ITOH, M., YONEMURA, S., FURUSE, M. & TSUKITA, S.** 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J. Cell Biol.* **13**:43– 47.

- ANDREWS, G. P., HROMOCKYJ, A. E., COKER, C. & MAURELLI, A. T.** 1991. Two novel virulence loci, *mxiA* and *mxiB*, in *Shigella flexneri* 2a facilitate excretion of invasion plasmid antigens. *Infect. Immun.* **59**:1997-2005.
- ARCE, S., NAWAR, H. F., RUSSELL, M. W. & CONNELL, T. D.** 2005. Differential binding of *Escherichia coli* enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and of cholera toxin elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells. *Infect. Immun.* **73**:2718-2727.
- ARRIAGA, Y., HARVILLE, B. & DREYFUS, L.** 1995. Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect. Immun.* **63**:4715-4720.
- BALDA, M. S., FALLON, M. B., VAN ITALLIE, C. M. & ANDERSON, J. M.** 1992. Structure, regulation, and pathophysiology of tight junctions in the gastrointestinal tract. *Yale J. Biol. Med.* **65**:725-735.
- BALDA, M. S., GONZALEZ-MARISCAL, L., MATTER, K., CEREIJIDO, M. & ANDERSON, J. M.** 1993. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J. Cell Biol.* **123**:293-302.
- BALKOVETZ, D. F. & KATZ, J.** 2003. Bacterial invasion by a paracellular route: divide and conquer. *Microbes Infect.* **5**:613-619.
- BANAN, A., ZHANG, L. J., SHAIKH, M., FIELDS, J. Z., CHOUDHARY, S., FORSYTH, C. B., FARHADI, A. & KESHAVARZIAN, A.** 2005. Theta isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isoforms: a novel mechanism for regulation of permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**:962-982.
- BARRIOS-RODILES, M., BROWN, K. R., OZDAMAR, B., BOSE, R., LIU, Z., DONOVAN, R. S., SHINJO, F., LIU, Y., DEMBOWY, J., TAYLOR, I. W., LUGA, V., PRZULJ, N., ROBINSON, M., SUZUKI, H., HAYASHIZAKI, Y., JURISICA, I. & WRANA, J. L.** 2005. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science.* **307**:1621-1625.

- BARTON, E., FORREST, J. & CONOLLY, J.** 2001. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*. **104**: 441–451.
- BASTIAENS, P. I., MAJOUL, I. V., VERVEER, P. J., SÖLING, H. & JOVIN, T.** 1996. Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *Embo. J.* **15**: 4246-4253.
- BAZZONI, G.** 2006. Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost.* **95**:36-42.
- BEAUSOLEIL, H.-E., LABRIE, V. & DUBREUIL, J. D.** 2002a. Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Toxicon*. **40**:185-191.
- BEAUSOLEIL, H. E., LÉPINE, F. & DUBREUIL, J. D.** 2002b. LC-MS analysis of pig intestine sulfatides: Interaction with *Escherichia coli* STb enterotoxin and characterization of molecular species present. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**:183–188.
- BENZ, I. & SCHMIDT, M. A.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **57**:1506-1511.
- BERBEROV, E. M., ZHOU, Y., FRANCIS, D. H., SCOTT, M. A., KACHMAN, S. D. & MOXLEY, R. A.** 2004. Relative Importance of Heat-Labile Enterotoxin in the Causation of Severe Diarrheal Disease in the Gnotobiotic Piglet Model by a Strain of Enterotoxigenic *Escherichia coli* That Produces Multiple Enterotoxins. *Infect. Immun.* **72**:3914-3924.
- BERKES, J., VISWANATHAN, V. K., SAVKOVIC, S. D. & HECHT, G.** 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*. **52**:439-451.
- BRITO, G. A., FUJJI, J., CARNEIRO-FILHO, B. A., LIMA, A. A., OBRIG, T. & GUERRANT, R. L.** 2002. Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. *J. Infect. Dis.* **186**:1438-1447.
- CARMAN, R.** 1997. *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic-associated diarrhoea of man and other animals. *Rev. Med. Microbiol.* **8(suppl 1)**:S43.

- CASSELS, F. J. & WOLF., M. K.** 1995. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **15**:214-226.
- CHAO, K. & DREYFUS, L.** 1997. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **65**:3209-3217.
- CHAO, K. L. & DREYFUS, L. A.** 1999. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with rat intestinal epithelial cells and membrane lipids. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**:91-97.
- CHEN, M., POTHOUKAKIS, C. & LAMONT, T.** 2002. Protein Kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to *Clostridium difficile* toxin A. *J. Biol. Chem.* **277**:4247– 4254.
- CHEN, M. L., GE, Z., FOX, J. G. & SCHAUER, D. B.** 2006. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **74**:6581-6589.
- CITI, S. & DENISENKO, N.** 1995. Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells. *J. Cell Sci.* **108**:2917-2926.
- CLARKE, H., SOLER, A. P. & MULLIN, J. M.** 2000. Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *J. Cell Sci.* **113**:3187-3196.
- CLAUDE, P.** 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J. Membr. Biol.* **39**:219-232.
- COHEN, C., SHIEH, J. & PICKLES, R.** 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* **98**:15191–15196.
- CONN, K. G. & KNUDSEN, K. A.** 1989. Effect of tight junctional resistance on penetration of LLC-PK1 epithelial cell layers by metastatic B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res.* **49**:7098-7105.



- CORDENONSI, M., MAZZON, E., DE RIGO, L., BARALDO, S., MEGGIO, F. & CITI, S.** 1997. Occludin dephosphorylation in early development of *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* **110**:3131-3139.
- CUI, W., LI, L. X., SUN, C. M., WEN, Y., ZHOU, Y., DONG, Y. L. & LIU, P.** 2010. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Bra. J. Med. Biol. Res.* **43**:330-337.
- DI PIERRO, M., LU, R., UZZAU, S., WANG, W., MARGARETTEN, K., PAZZANI, C., MAIMONE, F. & FASANO, A.** 2001. Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J. Biol. Chem.* **276**:19160-19165.
- DONNENBERG, M. S., TZIPORI, S., MCKEE, M. L., O'BRIEN, A. D., ALROY, J. & KAPER, J. B.** 1993. The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J. Clin. Inv.* **92**:1418-1424.
- DONNENBERG, M. S. & WHITTAM, T. S.** 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Clin. Inv.* **107**:539-548.
- DREYFUS, L. A., HARVILLE, B., HOWARD, D. E., SHABAN, R., BEATTY, D. M. & MORRIS, S. J.** 1993. Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STb). *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* **90**:3202-3206.
- DUBREUIL, J. D.** 2006. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b. In: ALOUF, J. E. & POPOFF, M. R. *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Third ed. London: Elsevier.
- DUBREUIL, J. D.** 1997. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology.* **143**:1783-1795.
- DUBREUIL, J. D.** 2008. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**:137-145.

- DUBREUIL, J. D., FAIRBROTHER, J. M., LALLIER, R. & LARIVIERE, S.** 1991. Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **59**: 198-203.
- DUBREUIL, J. D., LETELLIER, A. & HAREL, J.** 1996. A recombinant *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) fusion protein eliciting neutralizing antibodies. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **13**:317-323.
- EBNET, K., SCHULZ, C. U., MEYER ZU BRICKWEDDE, M. K., PENDL, G. G. & VESTWEBER, D.** 2000. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J. Biol. Chem.* **275**: 27979–27988.
- EDWARDS, R. A., KELLER, L. H. & SCHIFFERLI, D. M.** 1998. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene.* **207**:149-157.
- FAHERTY, C. S. & MAURELLI, A. T.** 2009. Spa15 of *Shigella flexneri* Is Secreted through the Type III Secretion System and Prevents Staurosporine-Induced Apoptosis. *Infect. Immun.* **77**: 5281-5290.
- FAIRBROTHER, J. M., NADEAU, E. & GYLES, C. L.** 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* **6**: 17-39.
- FANNING, A. S., JAMESON, B. J., JESAITIS, L. A. & ANDERSON, J. M.** 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**: 29745–29753.
- FANNING, A. S., MITIC, L. L. & ANDERSON, J. M.** 1999. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 1337-1345.
- FASANO, A.** 2002. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut.* 50 Suppl 3: III9-14.
- FASANO, A. & NATARO, J. P.** 2004. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**: 795-807.
- FEKETE, P. Z., SCHNEIDERB, G., OLASZD, F., BLUM-OEHLERB, G., HACKERB, J. H. & NAGY, B.** 2003. Detection of a plasmid-encoded

- pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. Int. J. Med. Microbiol. **293**: 287-298.
- FIorentini, C. & THELESTAM, M.** 1991. *Clostridium difficile* toxin A and its effects on cells. Toxicon. **29**: 543-67.
- FUJII, Y., NOMURA, T., YAMANAKA, H. & OKAMOTO, K.** 1997. Involvement of  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. Microbiol. Immun. **41**: 633-636.
- FURUSE, M., FUJITA, K., HIIRAGI, T., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S.** 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J. Cell. Biol. **141**: 1539-1550.
- FURUSE, M., HATA, M., FURUSE, K., YOSHIDA, Y., HARATAKE, A., SUGITANI, Y., NODA, T., KUBO, A. & TSUKITA, S.** 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J. Cell. Biol. **156**: 1099-1111.
- GAASTRA, W. & DE GRAAF, F. K.** 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. **46**:129-161
- GAASTRA, W. & SVENNERHOLM, A.-M.** 1996. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Trends Microbiol. **4**: 444 -452.
- GEORGE, W. L., ROLFE, R. D., HARDING, G. K., KLEIN, R., PUTNAM, C. W. & FINEGOLD, S. M.** 1982. *Clostridium difficile* and cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated pseudomembranous colitis. Infection. **10**:205-208.
- GHAJ, O., MENON, P. & BHAI, M.** 1980. Pathogenesis of diarrhea due to *Escherichia coli*. Ind. J. Ped. **47**: 311-316.
- GOECKELER, Z. M. & WYSOLMERSKI, R. B.** 1995. Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. J. Cell. Biol. **130**: 613-627.
- GOLDBERG, M. B. & SANSONETTI, P. J.** 1993. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. Infect. Immun. **61**: 4941-4946.

- GONÇALVES, C., BERTHIAUME, F., MOUREZ, M. & DUBREUIL, J. D.** 2008. *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**: 30-35.
- GONÇALVES, C., VACHON, V., SCHWARTZ, J.-L. & DUBREUIL, J. D.** 2007. The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.* **75**: 2208-2213.
- GONZALEZ-MARISCAL, L., BETANZOS, A., NAVA, P. & JARAMILLO, B.** 2003. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**: 1 - 44.
- GUIGNOT, J., CHAPLAIS, C., COCONNIER-POLTER, M. H. & SERVIN, A. L.** 2007. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell Microbiol.* **9**: 204-221.
- GUMBINER, B. & SIMONS, K.** 1986. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: Identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J. Cell. Biol.* **102**: 457 - 468.
- HANNA, P., MIETZNER, T. & MCCLANE, B.** 1991. Localization of the receptor-binding region of *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding regions. *J. Biol. Chem.* **266**: 11037–11043.
- HANNA, P., WIECKOWSKI, E. & MIETZNER, T.** 1992. Mapping of functional regions of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* **60**: 2110–2114.
- HARIHARAN, H., COLES, M., POOLE, D. & PAGE, R.** 2004. Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves from piglets and calves with diarrhea. *Can. Vet. J.* **45**: 605–606.
- HARNETT, N. M. & GYLES, C. L.** 1985 Enterotoxin plasmids in bovine and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of O groups 9, 20, 64 and 101. *Can. J. Med.* **49**: 79–87.

- HARTWIG, J. H., THELEN, M., ROSEN, A., JANMEY, P. A., NAIRN, A. C. & ADEREM, A.** 1992. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature*. **356**: 618-622.
- HARVILLE, B. A. & DREYFUS, L. A.** 1995. Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect. Immun.* **63**: 745-750.
- HARVILLE, B. A. & DREYFUS, L. A.** 1996. Release of serotonin from RBL-2H3 cells by the *Escherichia coli* peptide toxin STb. *Peptides*, **17**: 363-366.
- HEISKALA, M., PETERSON, P. A. & YANG, Y.** 2001. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic*, **2**: 93-98.
- HESHAM F. NAWAR, NATALIE D. KING-LYONS, J., OHN C. HU, RAYMOND C. PASEK & CONNELL, A. T. D.** 2010. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a nonmammalian Host. *Infect. Immun.* **78**:4705-4713
- HIRASE, T., STADDON, J. M., SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y., ITOH, M., FURUSE, M., FUJIMOTO, K., TSUKITA, S. & RUBIN, L. L.** 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell. Sci.* **110**:1603-1613.
- HIRST, T. R. & D'SOUZA, J. M.** 2006. *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* thermolabile enterotoxin. *In*: ALOUF, J. E. & POPOFF, M. R. (eds.) *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins* third edition ed. London: Elsevier.
- ITOH, M., FURUSE, M., MORITA, K., KUBOTA, K., SAITOU, M. & TSUKITA, S.** 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell. Biol.* **147**: 1351-1363.
- ITOH, M., FURUSE, M., MORITA, K., KUBOTA, K., SAITOU, M. & TSUKITA, S.** 1999a. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell. Biol.* **147**: 1351-1363.

- ITO, M., NAGAFUCHI, A., MOROI, S. & TSUKITA, S.** 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J. Cell. Biol.* **138**: 181 - 192.
- IZUMI, Y., HIROSE, T., TAMAI, Y., HIRAI, S., NAGASHIMA, Y., FUJIMOTO, T., TABUSE, Y., KEMPHUES, K. J. & OHNO, S.** 1998. An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J. Cell. Biol.* **143**: 95-106.
- JOBERTY, G., PETERSEN, C., GAO, L. & MACARA, I. G.** 2000. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell. Biol.* **2**: 531-9.
- JOU, T. S., SCHNEEBERGER, E. E. & NELSON, W. J.** 1998. Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J. Cell. Biol.* **142**: 101-115.
- JUST, I., SELZER, J., WILM, M., VON EICHEL-STREIBER, C., MANN, M. & AKTORIES, K.** 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*. **375**: 500–5003.
- KANG, L. I., WANG, Y., SUCKOW, A. T., CZYMMEK, K. J., COOKE, V. G., NAIK, U. P. & DUNCAN, M. K.** 2007. Deletion of JAM-A causes morphological defects in the corneal epithelium. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**: 576-585.
- KAPER, J. B., NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 123-140.
- KAPUS, A. & SZASZI, K.** 2006. Coupling between apical and paracellular transport processes. *Biochem. Cell. Biol.* **84**: 870-880.
- KARMALI, M. A., PETRIC, M., LIM, C., FLEMING, P. C. & STEELE, B. T.** 1983a. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet*. **2**:1299-1300.

- KARMALI, M. A., STEELE, B. T., PETRIC, M. & LIM, C.** 1983b. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*. **8325**: 619-620.
- KATAHIRA, J., INOUE, N., HORIGUCHI, Y., Matsuda, M. & Sugimoto, N.** 1997a. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Cell. Biol.* **136**:1239–47.
- KATAHIRA, J., SUGIYAMA, H. & INOUE, N.** 1997b. *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**: 26652–26658.
- KEITA, A. V. & SODERHOLM, J. D.** 2010. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol. Motil.* **22**: 718-733.
- KÖHLER, K. & ZAHRAOUI, A.** 2005. Tight junction: a coordinator of cell signalling and membrane trafficking. *Biol. Cell.* **97**: 659-665.
- KOSHY, S., MONTROSE, M. & SEARS, C.** 1996. Human intestinal epithelial cells swell and demonstrate actin rearrangement in response to the metalloprotease toxin of *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.* **64**: 5022–5028.
- KUBOTA, K., FURUSE, M., SASAKI, H., SONODA, N., FUJITA, K., NAGAFUCHI, A. & TSUKITA, S.** 1999.  $\text{Ca}^{2+}$ -independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr. Biol.* **9**: 1035-1038.
- LABRIE, V., BEAUSOLEIL, H.-E., HAREL, J. & DUBREUIL, J. D.** 2001b. Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology*, **147**: 3141-3148.
- LABRIE, V., HAREL, J. & DUBREUIL, J. D.** 2001a. Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic [alpha]-helix. *Biochim. Biophys. Acta.* **1535**: 128-133.
- LABRIE, V., HAREL, J. & DUBREUIL, J. D.** 2002. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) in vivo internalization within rat intestinal epithelial cells. *Vet. Res.* **33**: 223-228.

- LAWRENCE, A. D., URBAN, R. G., WHIPP, S. C., SLAUGHTER, C., TACHIAS, K. & KUPERSZTOCH, Y. M.** 1992. Purification of the STb enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol. Microbiol.* **6**: 2397–2406.
- LEE, C. H., HU, S. T., SWIATEK, P. J., MOSELEY, S. L., ALLEN, S. D. & SO, M.** 1985. Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. *J. Bacteriol.* **162**: 615-620.
- LEE, C. H., MOSELEY, S. L., MOON, H. W., WHIPP, S. C., GYLES, C. L. & SO, M.** 1983. Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infect. Immun.* **42**: 264-268.
- LEMMERS, C., EMMANUELLE MÉDINA, LANE-GUERMONPREZ, L., ARSANTO, J.-P. & BIVIC, A. L.** 2004. Rôle des protéines Crumbs dans le contrôle de la morphogenèse des cellules épithéliales et des photorécepteurs. *Méd. Sci.* **20**: 663-667.
- LI, Z., ELLIOTT, E., PAYNE, J., ISAACS, J., GUNNING, P. & O'LOUGHLIN E, V.** 1999. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* can impair T84 cell structure and function without inducing attaching/effacing lesions. *Infect. Immun.* **67**: 5938-5945.
- LU, R., WANG, W., UZZAU, S., VIGORITO, R., ZIELKE, H. R. & FASANO, A.** 2000. Affinity purification and partial characterization of the zonulin/zonula occludens toxin (Zot) receptor from human brain. *J. Neurochem.* **74**: 320-326.
- MADARA, J. L., MOORE, R. & CARLSON, S.** 1987. Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am. J. Physiol.* **253**: C854-861.
- MAINIL, J. G., BEX, F., JACQUEMIN, E., POHL, P., COUTURIER, M. & KAECKENBEECK, A.** 1990. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 187-190.



- MAKAROVA, O., ROH, M., LIU, C., LAURINEC, S. & MARGOLIS, B.** 2003. Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene*, **302**:21-29.
- MARANO, C. W., GARULACAN, L. A., GINANNI, N. & MULLIN, J. M.** 2001. Phorbol ester treatment increases paracellular permeability across IEC-18 gastrointestinal epithelium in vitro. *Dig. Dis. Sci.* **46**: 1490-1499.
- MATHEWSON, J. J., JOHNSON, P. C., DUPONT, H. L., MORGAN, D. R., THORNTON, S. A., WOOD, L. V. & ERICSSON, C. D.** 1985. A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **151**: 471-475.
- MCCARTHY, K. M., SKARE, I. B., STANKEWICH, M. C., FURUSE, M., TSUKITA, S., ROGERS, R. A., LYNCH, R. D. & SCHNEEBERGER, E. E.** 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.* **109**: 2287-98.
- MCCLANE, B.** 1994. *Clostridium perfringens* enterotoxin acts by producing small molecule permeability alterations in plasma membranes. *Toxicology*. **87**: 43-67.
- MCDANIEL, T. K., JARVIS, K. G., DONNENBERG, M. S. & KAPER, J. B.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **92**: 1664-1668.
- MEHTA, D. & MALIK, A. B.** 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* **86**: 279-367.
- MOKADY, D., GOPHNA, U. & RON, E. Z.** 2005. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 455-462.
- MONCRIEF, J., OBISO, R. & BARROSO, L.** 1995. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metallaprotease. *Infect. Immun.* **63**: 175-181.
- MOON, H. W., SCHNEIDER, R. A. & MOSELEY, S. L.** 1986. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 210-212.

- MOON, H. W., WHIPP, S. C., ARGENZIO, R. A., LEVINE, M. M. & GIANNELLA, R. A.** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* **41**: 1340-1351.
- MOORMAN, J. P., BOBAK, D. A. & HAHN, C. S.** 1996. Inactivation of the small GTP binding protein Rho induces multinucleate cell formation and apoptosis in murine T lymphoma EL4. *J. Immun.* **156**: 4146-4153.
- MORITA, K., FURUSE, M., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S.** 1999a. Claudin multigene family encoding four- transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **96**: 511-516.
- MORITA, K., SASAKI, H., FUJIMOTO, K., FURUSE, M. & TSUKITA, S.** 1999c. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J. Cell. Biol.* **145**: 579-588.
- MORITA, K., SASAKI, H., FURUSE, M. & TSUKITA, S.** 1999b. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* **147**: 185-194.
- MUKHERJEE, T., SQUILLANTEA, E., GILLESPIEB, M. & SHAO, J.** 2004. Transepithelial electrical resistance is not a reliable measurement of the Caco-2 monolayer integrity in Transwell. *Drug Deliv.* **11**: 11-18.
- MYERS, L., SHOOP, D. & STACKHOUSE, L.** 1987. Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 2330-2333.
- NAGY, B. & FEKETE, P. Z.** 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* **30**: 259-284.
- NAGY, B. & FEKETE, P. Z.** 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 443-454.
- NAGY, B. & Fekete, P. Z.** 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* **30**: 259-284.
- NATARO, J. P. & KAPER, J. B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.

- NATARO, J. P., KAPER, J. B., ROBINS-BROWNE, R., PRADO, V., VIAL, P. & LEVINE, M. M.** 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Ped. Infect. Dis. J.* **6**: 829-831.
- NATARO, J. P., SCALETSKY, I. C., KAPER, J. B., LEVINE, M. M. & TRABULSI, L. R.** 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **48**: 378-383.
- NEWSOME, P. M., BURGESS, M. N. & MULLAN, N. A.** 1978. Effect of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on cyclic GMP levels in mouse intestine. *Infect. Immun.* **22**: 290-291.
- NIEWERTH, U., FREY, A., VOSS, T., LE BOUGUENEC, C., BALJER, G., FRANKE, S. & SCHMIDT, M. A.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* **8**: 143-149.
- NISHIDA, K., KAZIRO, Y. & SATOH, T.** 1999. Anti-apoptotic function of Rac in hematopoietic cells. *Oncogene*, **18**: 407-415.
- NUNBHAKDI-CRAIG, V., MACHLEIDT, T., OGRIS, E., BELLOTTO, D., WHITE, C. L. & SONTAG, E.** 2002. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J. Cell. Biol.* **158**: 967-978.
- NUSRAT, A., GIRY, M., TURNER, J. R., COLGAN, S. P., PARKOS, C. A., CARNES, D., LEMICHEZ, E., BOQUET, P. & MADARA, J. L.** 1995. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* **92**: 10629-10633.
- NUSRAT, A., VON EICHEL-STREIBER, C. & TURNER, J.** 2001. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect. Immun.* **69**: 1329-1336.
- NUSRAT, A., VON EICHEL-STREIBER, C., TURNER, J. R., VERKADE, P., MADARA, J. L. & PARKOS, C. A.** 2001. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect. Immun.* **69**: 1329-1336.

- O'BRIEN, A. O., LIVELY, T. A., CHEN, M. E., ROTHMAN, S. W. & FORMAL, S. B.** 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. **1**: 702.
- OBISO, R., AZGHANI, A. & WILKINS, T.** 1997. The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. . Infect. Immun. **65**: 1431–1439.
- OKAMOTO, K., BABA, T., YAMANAKA, H., AKASHI, N. & FUJII, Y.** 1995. Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. J. Bacteriol. **177**: 4579-4586.
- ORSKOV, F. & ORSKOV, I.** 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can. J. Microbiol. **38**: 699-704.
- PALMERI, D., VAN ZANTE, A., HUANG, C. C., HEMMERICH, S. & ROSEN, S. D.** 2000. Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. J. Biol. Chem. **275**: 19139- 19145.
- PETERSON, J. W. & WHIPP, S. C.** 1995. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **63**: 1452-1461.
- PHILPOTT, D. J., MCKAY, D. M., MAK, W., PERDUE, M. H. & SHERMAN, P. M.** 1998. Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. Infect. Immun. **66**: 1680-1687.
- PHILPOTT, D. J., MCKAY, D. M., SHERMAN, P. M. & PERDUE, M. H.** 1996. Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. Am. J. Physiol., **270**: G634-45.
- PICKETT, C. L., TWIDDY, E. M., COKER, C. & HOLMES, R. K.** 1989. Cloning nucleotide sequence, and hybridization studies of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **171**: 4945-4952.

- POTHOULAKIS, C. & LAMONT, J. T.** 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am. J. Physiol. Gastro. Liver Physiol.* **280**: G178-183.
- QADRI, F., SVENNERHOLM, A.-M., FARUQUE, A. S. G. & SACK, R. B.** 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 465-483.
- RAHNER, C., MITIC, L.L., MCCLANE, B. A. & ANDERSON, J.M.** 1999. *Clostridium perfringens* enterotoxin impairs bile flow in the isolated perfused rat liver and induces fragmentation of tight junction fibrils. *Hepatology*, **30**: 326A.
- RAJASEKARAN, A. K. & RAJASEKARAN, S. A.** 2003. Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**: F388-396.
- RASHEED, J. K., GUZMÁN-VERDUZCO, L. M. & KUPERSZTOCH, Y. M.** 1990. Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. *Mol. Microbiol.* **4**: 265-273.
- RILEY, L. W., REMIS, R. S., HELGERSON, S. D., MCGEE, H. B., WELLS, J. G., DAVIS, B. R., HEBERT, R. J., OLCOTT, E. S., JOHNSON, L. M., HARGRETT, N. T., BLAKE, P. A. & COHEN, M. L.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl. J. Med.* **308**: 681-685.
- ROSEN, A., KEENAN, K. F., THELEN, M., NAIRN, A. C. & ADEREM, A.** 1990. Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *J. Exp. Med.* **172**: 1211-1215.
- ROUSSET, E., HAREL, J. & DUBREUIL, J. D.** 1998. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect. Immun.* **66**: 5650-5658.
- ROWE, B., TAYLOR, J. & BETTELHEIM, K. A.** 1970. An investigation of traveller's diarrhoea. *Lancet.* **1**: 1-5.

- WHIPP, S.C.** 1991. Intestinal responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in non-porcine species. *Am. J. Vet. Res.* **52**: 734-737.
- SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y., ITOH, M., FURUSE, M., INAZAWA, J., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S.** 1997. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur. J. Cell. Biol.* **73**: 222-231.
- SAITOU, M., FURUSE, M., SASAKI, H., SCHULZKE, J.-D., FROMM, M., TAKANO, H., NODA, T. & TSUKITA, S.** 2000. Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 4131-4142.
- SAKAKIBARA A, FURUSE M, SAITOU M, ANDO-AKATSUKA Y & TSUKITA, S.** 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell. Biol.* **137**: 1393–1401.
- SATO, T. & SHIMONISHI, Y.** 2004. Structural features of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin that activates membrane-associated guanylyl cyclase. *J. Pept. Res.* **63**: 200-206.
- SAWADA, N., MURATA, M., KIKUCHI, K., OSANAI, M., TOBIOKA, H., KOJIMA, T. & CHIBA, H.** 2003. Tight junctions and human diseases. *Med. Electron. Microsc.* **36**: 147-56.
- SCALETSKY, I. C., SILVA, M. L. & TRABULSI, L. R.** 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **45**: 534-536.
- SCHMIDT, E., KELLY, S. M. & VAN DER WALLE, C. F.** 2007. Tight junction modulation and biochemical characterisation of the zonula occludens toxin C-and N-termini. *FEBS Lett.* **581**: 2974-2980.
- SCHNEEBERGER, E. E. & LYNCH, R. D.** 1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* **262**: L647-661.
- SCHNEEBERGER, E. E. & LYNCH, R. D.** 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **286**: C1213-1228.

- SCHWAB, B. L., GUERINI, D., DIDSZUN, C., BANO, D., FERRANDO-MAY, E., FAVA, E., TAM, J., XU, D., XANTHOUDAKIS, S., NICHOLSON, D. W., CARAFOLI, E. & NICOTERA, P.** 2002. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell. Death Differ.* **9**: 818-831.
- SEARS, C. L. & KAPER, J. B.** 1996a. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* **60**: 167-215.
- SEARS, C. L. & KAPER, J. B.** 1996b. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* **60**: 167-215.
- SERIWATANA, J., ECHEVERRIA, P., TAYLOR, D. N., RASRINAUL, L., BROWN, J. E., PEIRIS, J. S. & CLAYTON, C. L.** 1988. Type II heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. *Infect. Immun.* **56**: 1158-1161.
- SERVIN, A. L.** 2005. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 264-292.
- SHERMAN, S., KLEIN, E. & MCCLANE, B.** 1994. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum. *J. Diarrh. Dis. Res.* **12**: 200-207.
- SHETH, P., BASUROY, S., LI, C., NAREN, A. P. & RAO, R. K.** 2003. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J. Biol. Chem.* **278**: 49239-49245.
- SIXMA, T. K., KALK, K. H., VAN ZANTEN, B. A. M., DAUTER, Z., KINGMA, J., WITHOLT, B. & HOL, W. G. J.** 1993. Refined Structure of *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin, a Close Relative of Cholera Toxin. *J. Mol. Biol.* **230**: 890-918.
- SMALL, P. L. & FALKOW, S.** 1988. Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **56**: 225-229.

- SMITH, H. W. & HALLS, S.** 1967. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. . J. Pathol. Bacteriol. **93**: 499-529.
- SPARKS, S., CARMAN, R. & SARKER, M.** 2001. Genotyping of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. J. Clin. Microbiol. **39**: 883–888.
- STEVENSON, B., SILICIANO, J., MOOSEKER, M. & GOODENOUGH, D.** 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J. Cell. Biol. **103**: 755-766.
- STRAUMAN, M. C., HARPER, J. M., HARRINGTON, S. M., BOLL, E. J. & NATARO, J. P.** 2010. Enteroaggregative *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions. Infect. Immun. **78**: 4958-4964.
- STREATFIELD, S. J., SANDKVIST, M., SIXMA, T. K., BAGDASARIAN, M., HOL, W. G. & HIRST, T. R.** 1992. Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) **89**: 12140-12144.
- STUART, R. O. & NIGAM, S. K.** 1995. Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) **92**: 6072-6076.
- SUKUMAR, M., RIZO, J., WALL, M., DREYFUS, L. A., KUPERSZTOCH, Y. M. & GIERASCH, L. M.** 1995. The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. Prot. Sci. **4**: 1718-1729.
- SUZUKI, A., YAMANAKA, T., HIROSE, T., MANABE, N., MIZUNO, K., SHIMIZU, M., AKIMOTO, K., IZUMI, Y., OHNISHI, T. & OHNO, S.** 2001. Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. J. Cell. Biol. **152**: 1183-1196.
- SYED, H. C. & DUBREUIL, J. D.** 2012. *Escherichia coli* STb toxin induces apoptosis in intestinal epithelial cell lines. Microb. Pathog. **53**:147-53



- TAFAZOLI, F., ZENG, C. Q., ESTES, M. K., MAGNUSSON, K. E. & SVENSSON, L.** 2001. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J. Virol.* **75**: 1540-1546.
- TAILLON, C., HANCOCK, M. A., MOUREZ, M. & DUBREUIL, J. D.** 2012. Biochemical and biological characterization of *Escherichia coli* STb His12 to Asn variant. *Toxicon*, **59**: 300-305.
- TAILLON, C., NADEAU, E., MOUREZ, M. & DUBREUIL, J. D.** 2008. Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from diseased pigs. *J. Med. Microbiol.* **57**: 887-890.
- TANG, D. G., TIMAR, J., GROSSI, I. M., RENAUD, C., KIMLER, V. A., DIGLIO, C. A., TAYLOR, J. D. & HONN, K. V.** 1993. The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE, induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells. *Exp. Cell. Res.* **207**: 361-375.
- TENERBERG, S., HIRST, T. R., ÅNGSTRÖM, J. & KARLSSON, K.-A.** 1994. Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. *Glycoconj. J.* **11**: 533-540.
- TERRES, A. M., PAJARES, J. M., HOPKINS, A. M., MURPHY, A., MORAN, A., BAIRD, A. W. & KELLEHER, D.** 1998. *Helicobacter pylori* disrupts epithelial barrier function in a process inhibited by protein kinase C activators. *Infect. Immun.* **66**: 2943-2950.
- THELEN, M., ROSEN, A., NAIRN, A. C. & ADEREM, A.** 1991. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature*, **351**: 320-322.
- TSUKITA, S. & FURUSE, M.** 1999. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell. Biol.* **9**: 268-273.
- TSUKITA, S. & FURUSE, M.** 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J. Cell. Biol.* **149**: 13-16.

- TURNER, J. R.** 2000. 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. . Semin. Cell. Dev. Biol. **11**: 301-308.
- TZIPORI, S., MONTANARO, J., ROBINS-BROWNE, R. M., VIAL, P., GIBSON, R. & LEVINE, M. M.** 1992. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect. Immun. **60**: 5302-5306.
- ULHAS, P. N. & MEGHNA, U. N.** 2008. Landes Bioscience Commentary & View Putting the brakes on cancer cell migration JAM-A restrains integrin activation. Cell. Adh. Migr. **2**: 4 249-251.
- URBAN, R. G., PIPPER, E. M., DREYFUS, L. A. & WHIPP, S. C.** 1990. High-level production of *Escherichia coli* STb heat-stable enterotoxin and quantification by a direct enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. **28**: 2383-2388.
- VAN DEN BROECK, W., COX, E., OUDEGA, B. & GODDEERIS, B. M.** 2000. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. Vet. Microbiol. **71**: 223-244.
- VAN HINSBERGH, V. W. & VAN NIEUW AMERONGEN, G. P.** 2002. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. J. Anat. **200**: 549-560.
- VIAL, P. A., ROBINS-BROWNE , R., LIOR, H., PRADO, V., KAPER, J. B., NATARO, J. P., MANEVAL, D., ELSAYED, A. & LEVINE, M. M.** 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. The J. Infect. Dis. **158**: 70-79.
- VIDOTTO, M. C., LIMA, N. C. S. D., FRITZEN, J. T. T., FREITAS, J. C. D., VENÂNCIO, E. J. & ONO, M. A.** 2009. Frequency of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea in the North Parana State, Brazil. Bra. J. Microbiol. **40**: 199-204.
- VU-KHAC, H., HOLODA, E., PILIPCINEC, E., BLANCO, M., BLANCO, J. E., DAHBI, G., MORA, A., LOPEZ, C., GONZALEZ, E. A. & BLANCO, J.** 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. Vet. J. **174**: 176-187.

- WEINTRAUB, A.** 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. J. Med. Microbiol. **56**: 4-8.
- WEIPING.ZHANG, CHENGXIAN.ZHANG, H.FRANCIS, D., YING.FANG, DAVID KNUDSEN, NATARO, J. P. & ROBERTSON, D. C.** 2010. Genetic Fusions of Heat-Labile (LT) and Heat-Stable (ST) Toxoids of Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* Elicit Neutralizing Anti-LT and Anti-STa antibodies . Infect. Immun. **78**: 316-325.
- WHITTAN, T. S.** 1996. Génetic variation and evolutionary processes in natural populations of *Escherichia Coli*. In: F.C.NERDhardt (ed.) *E. coli and salmonella: cellular and molecular biology*. Washington,DC,USA: ASM Press
- WIECKOWSKI, E., WNEK, A. & MCCLANE, B.** 1994. Evidence that an approximately 50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound *Clostridium perfringens* enterotoxin. J. Biol. Chem. **269**: 10838–10848.
- WU, S., LIM, K. & HUANG, J.** 1998. Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) **95**: 14979–14984.
- YAMANAKA, H., KAMEYAMA, M., BABA, T., FUJII, Y. & OKAMOTO, K.** 1994. Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I: requirement of DsbA for disulfide bond formation. J. Bacteriol. **176**: 2906-2913.
- YAMANAKA, H., KOBAYASHI, H., TAKAHASHI, E. & OKAMOTO, K.** 2008. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. J. Bacteriol. **190**: 7693-7698.
- YOU, J., XU, Y., HE, M., MCALLISTER, T., THACKER, P., LI, X., WANG, T. & JIN, L.** 2010. Protection of mice against enterotoxigenic *E.coli* by immunization with a polyvalent enterotoxin comprising a combination of LTb,STa and STb. Appl. Microbiol. Biotechnol. **89**: 1885-1893.
- YUHAN, R., KOUTSOURIS, A., SAVKOVIC, S. D. & HECHT, G.** 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. Gastroenterology, **113**: 1873-1882.

- ZAHRAOUI, A.** 2004. « Les jonctions serrées : plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires ». *Med. Sci.* **20**: 580-585.
- ZHANG, W., ZHAO, M., RUESCH, L., OMOT, A. & FRANCIS, D.** 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet. Microbiol.* **123**: 145-152.